



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Ecotoxicologie*

Thierry POLARD

Titre :

*Caractérisation des effets génotoxiques sur poissons de produits phytosanitaires
en période de crue*

JURY :

BETOULLE Stéphane, Maître de Conférences, Université de Reims	Rapporteur
CACHOT Jérôme, Professeur des Universités, Université de Bordeaux I	Rapporteur
LEK Sovannarath, Professeur des Universités, Toulouse III	Président
DEVAUX Alain, Ingénieur E.N.T.P.E	Examineur
JEAN Séverine, Maître de Conférences, I.N.P- E.N.S.A.T	Co-Directeur de thèse
PINELLI Eric, Professeur des Universités, I.N.P- E.N.S.A.T	Examineur
Membre invité	
GAUTHIER Laury, Maître de Conférences, Toulouse III	Co-Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)*

Unité de Recherche : *EcoLab – Laboratoire d'écologie fonctionnelle (UMR 5245)*

Directeurs de Thèse : *Laury GAUTHIER, Séverine JEAN*

A toute ma famille,

A Tiphaine,

Remerciements

Je tiens à profiter de ce manuscrit pour remercier tous ceux qui ont permis, directement ou indirectement, la réalisation de ce travail au sein du laboratoire « Ecolab », UMR 5245.

Séverine JEAN et Laury GAUTHIER ont assuré l'encadrement cette thèse. Je les remercie pour leurs nombreux conseils, inestimables, et leur patience, mise à l'épreuve mais inébranlable. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Eric PINELLI, directeur de l'équipe « Ecotoxicologie & génotoxicité environnementale ». Son écoute attentive et ses analyses ont largement contribué au résultat final.

Je tiens également à remercier messieurs Jérôme CACHOT, Professeur à l'université de Bordeaux I et Stéphane BETOULLE, Maître de Conférence à l'université Reims, d'avoir accepté la lourde tâche d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis aussi reconnaissant à messieurs Alain DEVAUX et Sovan LEK d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Georges MERLINA et Christophe LAPLANCHE ont été des alliés indispensables en ce qui concerne respectivement la chimie et les analyses statistiques. La mise en œuvre de ces outils n'aurait pas été possible sans leur expertise. Caroline CASADEMONT-GOMIERO a également réalisé un travail considérable dans le domaine des analyses chimiques, et je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance. Je tiens aussi à remercier Florence MOUCHET qui m'a largement fait profiter de son expérience quant aux tests de génotoxicité. Impossible d'aborder les aspects techniques sans souligner la participation de Jérôme SILVESTRE sur des aspects aussi variés que la microscopie, la logistique matérielle et l'aménagement des zones de stabulation.

Je tiens également à remercier Annick CORREGE, qui m'a guidé dans le dédale administratif, mais qui est avant tout la garante de la cohésion au sein du laboratoire. Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du laboratoire, en commençant par José Miguel SANCHEZ-PEREZ coordinateur du programme

Aquaflash, sans oublier Jean-Luc PROBST, Sabine SAUVAGE et Hugues ALEXANDRE. Francis DAUBA, Puy LIM et Lilian PACAUX savent à quel point j'ai apprécié participer aux campagnes de terrain en leur compagnie. René NOUILHAN et Christian BEAUPUY, en charge de l'atelier, m'ont été d'une grande aide pour de nombreux aspects pratiques, notamment la fabrication des cages d'expositions auxquelles ils ont consacré beaucoup de leur temps. Enfin, les expérimentations mises en place dans le cadre de cette thèse n'auraient pas pu être effectuées sans la contribution de stagiaires, Paola CHAVEZ, Julien DUMAS, Cynthia MARTINEZ et celle du personnel du laboratoire, à savoir, Hélène BENQUET, Cathy GIOVANNINI, Marie-José TAVELLA, Virginie PAYRE et Annie PERRAULT.

J'ai également une pensée pour tous les doctorants et jeunes docteurs du laboratoire que j'ai eu la chance de rencontrer : Chantha OEURNING, Laurie BOITHIAS, David BAILLY, Matthieu MOUCLIER, Adeline BUISSET, Bertrand POURRUT, Tim DEBENEST, Geoffrey PERCHET, et Damien DEVAULT, dont les travaux ont posé certaines bases du travail présenté dans ce manuscrit. Parmi les rencontres qui ont comptées au cours de ces trois ans, les collègues du bureau 0219 occupent évidemment une place particulière : Lobat TAGHAVI, Arshad MUHAMMAD, Sahid MUHAMMAD, Désirée EL-AZZI, Floriane BOURDIOL, Aurélie VIOLETTE et Roman TEISSERENC.

Que tous ceux, qui de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance

Résumé

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse visent à évaluer l'impact biologique des flashes de contaminations d'origine agricole associés aux crues.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer les effets génotoxiques de tels événements. Ces mesures renseignent sur des effets précoces et pertinents écologiquement. Après avoir optimisé et validé le test micronoyaux dans nos conditions expérimentales, nous l'avons utilisé conjointement avec l'essai comète pour tester le potentiel génotoxique de 3 conditions hydrologiques contrastées. Il a ainsi été mis en évidence une plus grande génotoxicité de l'eau de la Save prélevée lors d'une crue de printemps par rapport à une crue d'hiver ou un débit de base. Ces résultats ont ensuite été confrontés avec ceux observés lors d'expositions à des mélanges expérimentaux reconstituant les contaminations observées dans le milieu. Les effets génotoxiques des mélanges d'herbicides ont été confirmés, et la complexité des mécanismes induisant la toxicité lors des épisodes de crues a été mise en évidence.

Dans un second temps, afin de caractériser la contamination des organismes lors des épisodes de crue, un protocole d'extraction et d'analyse des herbicides accumulés dans les tissus de poissons a été évalué.

Mot clés : Poissons ; *Carassius carassius* ; *Barbus barbus* ; Herbicides, Chloroacétanilides, Triazines, Urées substituées ; Crue ; Génotoxicité ; Essai comète ; Essai micronoyau.

Abstract

This study aims at evaluating the biological impact of transient agricultural contamination events associated with floods.

First, we investigated the genotoxic impact of such contamination events. These measures provide early and ecologically relevant data. Then, after the optimization and validation of the micronucleus assay in our experimental conditions, this test has been used together with the comet assay in order to test the genotoxic potential of 3 contrasted hydrological conditions. Spring flood water has been found to be more genotoxic than winter flood water or water sampled during the basal flow. These results have been compared with those of exposure to experimental mixtures, mimicking field contamination. The genotoxic potential of herbicides mixture has been confirmed, and the complexity of the processes inducing the toxicity during flood events has been highlighted.

Second, in order to investigate the contamination pattern during flood events, a protocol allowing the extraction and quantification of the herbicides accumulated in fish tissues has been evaluated.

Keywords: Fish; Herbicides, Flood; Genotoxicity; *Carassius carassius*; *Barbus barbus*; Chloroacetanilides; Triazines; Substituted Ureas; comet assay; micronucleus assay.

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Introduction générale	5

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Usage et devenir des herbicides	11
<u>1. L'utilisation des phytosanitaires</u>	<u>11</u>
1.1 Les enjeux	11
1.2 Le marché des phytosanitaires	11
1.3 L'évolution des pratiques	12
1.4 La diversité des herbicides	13
1.4.1 La mise sur le marché des nouvelles molécules	13
1.4.2 Les différentes familles d'herbicides	15
<u>2. Le devenir des contaminants dans le milieu</u>	<u>18</u>
2.1 Les facteurs clés	18
2.2 La dégradation	20
2.3 Les transferts	20
2.3.1 La rétention	20
2.3.2 Les transferts aériens	21
2.3.3 Les transferts par l'eau	21
2.4 La surveillance de la qualité des eaux de surface	23
2.4.1 Les réseaux de surveillance	23
2.4.2 Les normes de qualité environnementale	23
2.4.3 Les bilans de qualité chimique de l'eau	25
2.5 Le cas particulier des crues	28
2.5.1 Les mécanismes impliqués	28
2.5.2 Les conséquences	29

Chapitre 2. Evaluation de l'impact des herbicides sur la qualité biologique des milieux aquatiques	31
<u>1. Les stratégies d'étude.....</u>	<u>31</u>
<u>2. Effets des herbicides sur les poissons.....</u>	<u>32</u>
2.1 Les biomarqueurs	32
2.2 A l'échelle cellulaire	34
2.2.1 Protéines inductibles	34
2.2.2 Les mécanismes de défense antioxydants	36
2.2.3 Peroxydation lipidique	38
2.2.4 Biomarqueurs de génotoxicité.....	39
2.3 A l'échelle individuelle (Biomarqueurs Physiologiques)	41
2.3.1 Neurotoxicité (AchE)	41
2.3.2 Endocrinologie	42
2.3.3 Immunologie.....	44
2.3.4 Métabolisme énergétique.....	44
2.3.5 Histologie	45
2.3.6 Croissance	46
2.3.7 Comportement	47
2.3.8 Reproduction.....	47
2.4 Populations et communautés	49
2.5 Eléments de choix des biomarqueurs au regard des objectifs de l'étude	49
Chapitre 3 Les biomarqueurs de génotoxicité.....	55
<u>1. Les différents biomarqueurs de génotoxicité</u>	<u>55</u>
1.1. Mesure des anomalies chromosomiques par le test des micronoyaux.....	56
1.2. Mesure des cassures de brins de l'ADN par l'essai comète	60
<u>2. Les avantages</u>	<u>63</u>
2.1 Une réponse précoce et intégratrice.....	63
2.2 La pertinence écologique.....	64

Chapitre 4. L'accumulation des molécules dans les tissus biologiques en tant qu'outil pour caractériser la contamination des écosystèmes aquatiques..... 69

1.Introduction..... 69

2. Le biote en tant qu'intégrateur de la contamination 70

3. Les facteurs conditionnant l'accumulation des herbicides dans les matrices biologiques 71

4. Le dosage des herbicides dans les poissons : l'état de l'art 73

Synthèse et objectifs de l'étude 77

Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1. Contexte expérimental..... 81

1. La zone d'étude 81

1.1 Le réseau hydrographique 81

1.2 Description du site d'étude, La Save 82

1.2.1 Caractéristiques du sol..... 85

1.2.2 Usage du bassin versant..... 85

1.2.3 La station d'étude de Larra 86

1.3 Suivi hydrologique du cours d'eau 86

2. Le modèle biologique, le carassin commun (*Carassius carassius*) 87

3. Les tests de génotoxicité 89

3.1 Le test comète : description du protocole 89

3.2 Le test MN : validation expérimentale du protocole 93

*Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation
for use in water quality monitoring*

Chapitre 2. Impact mutagène pour le poisson des épisodes de crues dans le sud ouest de la France	99
<u>1. Introduction</u>	99
<u>2. Etude expérimentale de l'impact génotoxique de la contamination par les herbicides associée aux épisodes de crue</u>	101
<i>Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France.</i>	
<u>3. Evaluation des effets associés à un mélange d'herbicides représentatif de l'ensemble des situations de crues dans les cours d'eau Gascons</u>	104
3.1 Introduction	104
3.2 Matériel et méthode	105
3.2.1 Elaboration du mélange	105
3.2.2 Design expérimental	106
3.3 Résultats	107
3.4 Discussion	109
<u>4. Evaluation <i>in situ</i> de l'impact génotoxique des crues sur poissons natifs</u>	112
4.1 Introduction	112
4.2 Matériel et méthode	113
4.2.1 Le modèle biologique	113
4.2.2 Protocole d'encagement	114
4.3 Résultats.....	116
4.4 Discussion	117
Chapitre 3 : Dosage des herbicides dans les matrices biologiques	120
<u>1. Introduction</u>	120
<u>2. Méthode d'extraction des contaminants organiques dans les matrices biologiques : état de l'art et choix de la méthode</u>	121
2.1 Extraction.....	121

2.2 Purification.....	123
<u>3. Evaluation d'un protocole d'extraction multi résidus par ASE</u>	125
3.1 Introduction.....	125
3.2 Matériel et méthode	125
3.2.1 Consommables et matériel	125
3.2.2 Préparation des échantillons.....	126
3.2.3 Extraction à l'ASE	127
3.2.4 Echange de phase, bullage et contre-extraction	128
3.2.5 Purification	129
3.2.6 Analyse GC-MS	130
3.3 Résultats	130
3.4 Discussion	132
Chapitre 4. Discussion générale et perspectives	136
1. <u>Etude des événements courts de contamination</u>	136
1.1 Stratégie d'exposition	136
1.2 Validation des outils.....	137
<u>2. Influence du contexte environnemental</u>	139
2.1 La complexité de la contamination	139
2.1.1 Le mélange de contaminants	139
2.1.2 La présence de métabolites	141
2.2 Les facteurs environnementaux modulant l'impact de la contamination	142
2.2.1 Les facteurs abiotiques	142
2.2.2 Les facteurs biotiques	144
<u>3. Les perspectives</u>	146
Références	150

Liste des figures

Figure 1 : comparaison des rendements mondiaux moyens obtenus avec ou sans produits phytosanitaires; données de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), citées par l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP)	11
Figure 2 : Schéma synthétique de la directive 91/414/CE concernant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un produit phytosanitaire (Debenest, 2007)	14
Figure 3 : Devenir dans l'environnement des herbicides appliqués en zones agricoles	18
Figure 4 : Palmarès des molécules les plus détectées dans l'eau de surface en France en 2007 (Commissariat général au développement durable, 2010) Note : * molécules interdites en 2007, les métabolites apparaissent en vert et les substances dotées de NQE en bleu foncé.	26
Figure 5 : Carte de répartition de contamination de l'eau en surface en France – pesticides totaux (Source Agence de l'Eau, 2007 – MEEDDM, BD Carthage, 2008. Traitement : SOeS, 2009)	27
Figure 6 : Contributions des différents écoulements intervenant en période de crue (Taghavi, 2010)	28
Figure 7 : Schéma de réponse des organismes aux effets délétères d'une exposition à un polluant D'après Van der Oost et al., 2003)	33
Figure 8 : Rôle des enzymes antioxydantes dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. (Cajaraville et al., 2003 dans Larno, 2004)	37
Figure 9 : Séquence de réaction de peroxydation lipidique (Vickers, d'après Young et McEneny, 2001)	38
Figure 10 : Illustration de la complexité des relations entre les facteurs de stress et les réponses biologiques (Adapté de Power et Mac Carthy, 1997)	50
Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge 1994). B1 à B4 : représentations schématiques des réponses de 4 biomarqueurs	51
Figure 12 : Représentation schématique des relations entre pertinence écologique et échelle de temps des réponses de biomarqueurs induites par une exposition à un polluant (D'après Adams et al., 1989)	52
Figure 13 : Exemples de dommages à l'ADN (D'après Devaux, 2006)	55
Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de formation des micronoyaux dans les cellules (Al-Sabti et Metcalfe, 1995)	57
Figure 15 : Comète. A : tête ; B : queue. (érythrocyte de carassin exposé à un génotoxique de référence)	61
Figure 16 : Impact des dommages génétiques aux échelles biologiques supérieures (D'après Jha, 2008)	64
Figure 17 : Modèle général de l'allocation énergétique chez les organismes. (Jha, 2008, adapté de Calow et Sibly)	66
Figure 18 : Diagramme conceptuel des flux et transferts de composés chimiques dans l'écosystème aquatique en relation avec la bioconcentration et la bioaccumulation. (Tagaki, 2010)	71

Figure 19 : Corrélation entre le log Kow et le facteur de bioconcentration des herbicides chez le poisson pour les pesticides développés depuis 10 ans (Takagi, 2010).....	72
Figure 20 : Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne (Source : http://www.hist-geo.com et K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)	81
Figure 21 : Photographies du site de Larra : a) en crue; b) en étiage (Crédit photo : Teisserenc, R.)	84
Figure 22 : L'occupation du sol du bassin versant de la Save. En vert, forêts et prairies, en jaune, cultures (Macary et al., 2006)	85
Figure 23 : Débit mensuel moyen de la Save à Larra (Données CACG ; traitement Oeurng, 2010)	86
Figure 24 : Hydrogramme de la Save entre avril 2008 et avril 2010.....	87
Figure 25 : Le carassin commun (<i>Carassius carassius</i>) (Source ; http://www.fishingcy.com).....	88
Figure 26 : Protocole schématisé de l'essai comète	89
Figure 27 : Niveaux de dommage de l'ADN, mesurés par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes, chez les poissons exposés au mélange expérimental pendant 96h	107
Figure 28 : Fréquences de micronoyaux (‰) mesurées dans les érythrocytes circulants des poissons exposés au mélange expérimental pendant 96h. (Moyenne ± écart-type)	108
Figure 29 : Le barbeau fluviatile (<i>Barbus barbus</i>) (source : Direction de l'économie publique du canton de Berne)	113
Figure 30 : Aire géographique de répartition du barbeau fluviatile (Adapté de Lelek, 1987 dans Kotlik et Berrebi, 2001).....	113
Figure 31 : Cages installées sur le site de Larra	115
Figure 32 : Hydrogramme de la Save à Larra au cours des périodes d'exposition. La barre bleue représente la période d'exposition du lot 1 ; La barre verte représente la période d'exposition du lot 2...115	
Figure 33 : Niveau de dommages à l'ADN évalué par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes pour les érythrocytes circulants des poissons maintenus en laboratoire (T1 et T2) ou exposés sur la Save (E1 relevé avant la crue ; E2 relevé après la crue)	116
Figure 34 : Fréquence de micronoyaux (‰) mesurée dans les érythrocytes circulants des poissons maintenus en laboratoire (T1 et T2) ou exposés sur la Save (E1 relevé avant la crue ; E2 relevé après la crue).....	117
Figure 35 : Représentation schématique du protocole d'extraction	126
Figure 36 : Rendement et reproductibilité du protocole d'extraction à 1 µg.g ⁻¹ pour chacune des molécules testées	131
Figure 37 : Rendement et reproductibilité du protocole d'extraction à 0,1 µg.g ⁻¹ pour chacune des molécules testées	132

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales familles d'herbicides et leur mode d'action	15
Tableau 2 : Processus de transfert et de dégradation mis en œuvre dans les mouvements et le devenir des contaminants organiques. (Marathon-Agricultural and environmental consulting, Inc.1992).	19
Tableau 3 : Liste des pesticides classés en tant que substances prioritaires et les valeurs de NQE ; H : Herbicide ; I : Insecticide	24
Tableau 4 : Caractéristiques des molécules intégrées au mélange	105
Tableau 5 : Concentrations des molécules dans le mélange	106
Tableau 6 : Caractéristiques des molécules spikées.....	127
Tableau 7 : Paramètres d'extraction.....	128
Tableau 8 : Conditions d'analyse en GC-MS	130

Introduction générale

Parmi les moyens mis en œuvre pour améliorer les capacités de production agricole, l'utilisation des produits phytosanitaires en général, et des herbicides en particulier, est fréquent. Sur les zones de cultures où ils sont appliqués, ils favorisent les rendements, notamment en éliminant les plantes compétitrices. Cependant, à la suite de leur application ces molécules peuvent être exportées vers les écosystèmes aquatiques. Le dernier rapport en date du commissariat général au développement durable (CGDD) révèle ainsi une contamination généralisée des cours d'eau français : en 2007, des produits phytosanitaires ont été détectés dans 91% des points de mesure. Les 15 molécules les plus détectées étaient des herbicides ou leurs métabolites.

Ce constat traduit une situation à l'échelle nationale, pour une année de mesure. Or, la contamination des cours d'eau n'est homogène ni dans l'espace, ni dans le temps. Ainsi, les zones de grandes cultures telles que le bassin parisien ou le sud-ouest de la France sont les plus contaminées par les herbicides. De la même façon, la contamination est plus intense au cours des périodes de traitement et lorsque les transferts sont favorisés par la pluie. Dans les cours d'eau gascons, des pics de contamination dans les eaux de surface ont ainsi été mis en évidence lors des crues de printemps, lorsque les herbicides de prélevée appliqués sur sol nu sont exportés sous forme dissoute ou adsorbée sur des particules du sol.

De nombreux organismes non-cibles sont exposés à cette contamination chimique. Des données existent concernant la toxicité de ces molécules. En effet, chacune d'entre elle a été soumise à une autorisation de mise sur le marché impliquant une étude toxicologique sur des organismes modèles. Ces données sont régulièrement complétées par des suivis de biomarqueurs sur des organismes exposés en conditions contrôlées. Ces études cherchent le plus souvent à associer un effet mesuré à des conditions d'expositions simples. Dans ce contexte, la complexité du milieu naturel, impliquant les paramètres environnementaux et les interactions entre les contaminants n'est pas considérée. A l'inverse, d'autres études se basent sur des mesures effectuées sur des organismes prélevés directement dans le milieu. L'influence de celui-ci est alors intégré dans sa globalité, depuis que

l'individu y est exposé. Il est alors souvent délicat d'attribuer l'effet mesuré à une cause identifiée, tant en terme de nature de contaminants que d'événements de contamination.

Le manque de connaissances est particulièrement marqué en ce qui concerne les effets des contaminations brèves mais intenses associées aux épisodes de crues. Ces événements ont-ils un impact sur la qualité biologique des cours d'eau ? L'objectif de ce travail de thèse est d'explorer l'impact de la contamination par les herbicides sur la qualité biologique des cours d'eau en portant un intérêt particulier aux épisodes de crues.

Dans le cadre de cette thèse, deux axes de travail ont été développés. D'une part, nous nous sommes attachés à évaluer des effets biologiques à la fois précoces et significatifs écologiquement par le biais de mesures de génotoxicité. D'autre part nous avons cherché à caractériser l'exposition des organismes aux herbicides au moyen de mesures d'accumulation de ces molécules dans les tissus.

Pour évaluer les effets biologiques de ce type de contamination, il est apparu nécessaire de disposer de mesures permettant leur détection précoce tout en étant significatif dans un cadre écologique. A ce titre, nous avons cherché à explorer d'éventuels effets génotoxiques, mesurés à l'échelle moléculaire mais associés à des effets aux échelles biologiques supérieures. Afin de disposer d'outils valides dans ce contexte expérimental, un effort d'optimisation a été nécessaire quant au test micronoyaux (MN). Utilisé conjointement avec le test des comètes, il nous a permis d'évaluer le potentiel génotoxique i) de l'eau de la Save en fonction du contexte hydrologique et ii) des mélanges d'herbicides qui y sont présents.

L'un des enjeux de ce travail était d'isoler les effets de la contamination par les herbicides tout en la considérant dans un contexte environnemental réaliste. Pour cela, nous avons choisi de mener les expérimentations en combinant différents types d'exposition. Dans un premier temps, un organisme modèle, le carassin commun (*Carrassius carassius*), a été utilisé en laboratoire. Les poissons ont été exposés à de l'eau prélevée dans un cours d'eau Gascon représentatif, la Save, ou à des mélanges expérimentaux reconstituant la contamination de l'eau par les herbicides.

Dans un second temps, un autre organisme modèle, le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) a été exposé à une crue, encagé sur le terrain. Les résultats issus des différents types d'exposition ont été confrontés dans l'objectif d'isoler l'impact biologique associé à la seule présence des herbicides dans l'eau, mais également d'apprécier l'influence de la complexité du milieu.

Par ailleurs, on ne dispose à l'heure actuelle que de très peu de connaissances concernant l'accumulation, dans les tissus biologiques, des herbicides les plus utilisés actuellement. Or ces données pourraient permettre d'appréhender la qualité chimique du milieu en intégrant, via un filtre biologique, la contamination à laquelle sont exposés les organismes aquatiques. A ce titre, un protocole d'extraction multi-résidus (chloroacétanilides, triazines et urées substituées) utilisant un extracteur à haute pression a été évalué.

Ce manuscrit s'articule en deux parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique. Dans un premier temps, elle vise à rappeler quels produits phytosanitaires sont susceptibles de contaminer les cours d'eau français, et par quels processus ils y sont exportés. Dans un second temps, un bilan des connaissances actuelles concernant les effets connus des herbicides sur les poissons est effectué. Cette revue bibliographique aborde enfin l'état de l'art concernant l'accumulation des herbicides dans les matrices biologiques. La deuxième partie porte sur le travail expérimental. Un premier chapitre décrit le contexte de l'étude en présentant le site d'étude ainsi que les démarches d'optimisation effectuées pour valider le test MN dans nos conditions environnementales. Le second présente les impacts biologiques d'eaux de rivière prélevées dans différents contextes hydrologiques, ainsi que ceux des mélanges d'herbicides associés, sur des carassins exposés au laboratoire. Il décrit ensuite les effets d'une crue vis-à-vis de barbeaux fluviatiles exposés sur le site. Le troisième chapitre détaille le protocole d'extraction multirésidu d'herbicides dans les tissus de poisson et son évaluation. Enfin, une synthèse des résultats vise à mettre en lumière les principales implications et perspectives de ce travail de thèse.

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Usage et devenir des herbicides

1) L'utilisation des phytosanitaires

1.1 Les enjeux

L'utilisation des produits phytosanitaires vise à optimiser l'utilisation de la surface agricole en améliorant les rendements et en sécurisant les récoltes. Les estimations des rendements mondiaux moyens pour les principales cultures sont présentées dans la figure 1 qui compare les rendements obtenus en utilisant, ou non, des phytosanitaires.

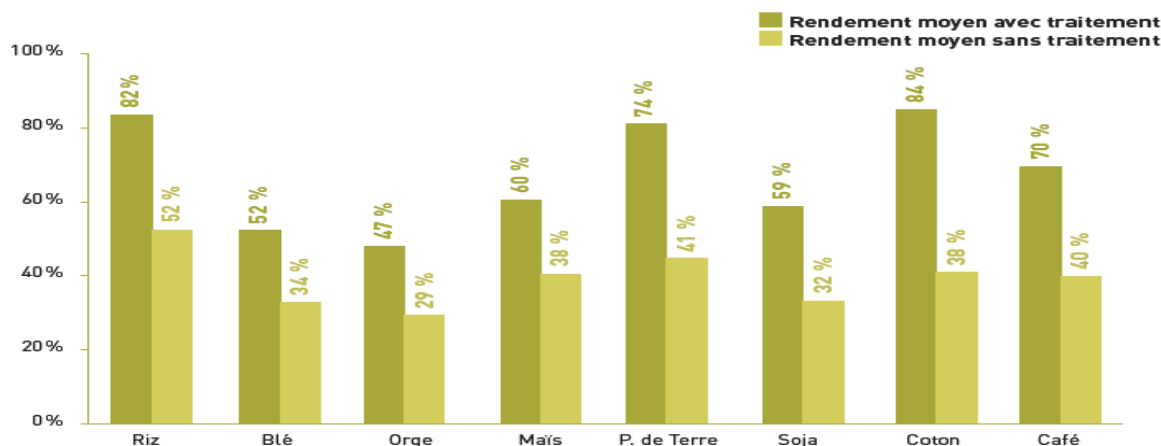


Figure 1 : comparaison des rendements mondiaux moyens obtenus avec ou sans produits phytosanitaires; données de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), citées par l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP).

1.2 Le marché des phytosanitaires

Dans le cadre d'un modèle productiviste, les avantages permis par l'utilisation des produits phytosanitaires sont tels que ces molécules représentent un enjeu, et donc un marché, considérable. A l'échelle globale, le marché des produits phytosanitaires a représenté presque 38 milliards de dollars pour l'année 2009. L'Europe concentre plus de 30% de ce marché mondial, devant l'Asie (24,4%), l'Amérique du Nord (21%) et l'Amérique latine (20,3%). Les herbicides constituent près de la moitié des molécules utilisées (46,9%). Ils sont principalement appliqués

en Europe et en Amérique du Nord sur les grandes cultures céréalières et le maïs. Les fongicides et insecticides sont quant à eux plutôt utilisés dans les régions tropicales pour la culture maraîchère et sur les vignes, le riz et les cultures de rente comme le coton, le café ou le cacao.

La France est 4^{ème} consommateur mondial de produits phytosanitaires derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon, et donc le premier consommateur européen. Environ 63.000 tonnes de substances actives ont été utilisées en 2009. Le marché des herbicides en France s'explique notamment par la surface du sol occupée par les grandes cultures traitées par les herbicides et par l'importance de la viticulture qui utilise traditionnellement une quantité importante de fongicides et insecticides. Par ailleurs, si l'agriculture est la principale activité consommatrice des produits phytosanitaires, elle n'est pas la seule. En France, le milieu non agricole (jardiniers amateurs, collectivités locales) représente environ 5% des usages en pesticides.

A l'échelle de la Région Midi-Pyrénées, la superficie des terres arables représente environ 69% de la surface des terres agricoles, soit 1.615.536 hectares. Les herbicides, majoritairement utilisés pour la culture des céréales et oléagineux sont donc utilisés en quantité importante.

1.3 L'évolution des pratiques

L'évolution des usages de produits phytopharmaceutiques est difficile à appréhender. En effet, les quantités de produits épandues varient en fonction des molécules utilisées (Aubertot et al. 2005). La tendance allant vers l'usage de produits efficaces à plus faible dose, une baisse des volumes appliqués n'est pas synonyme d'une baisse de l'intensité de traitement. De plus, l'usage des phytosanitaires est ajusté en fonction des paramètres environnementaux qui varient d'année en année. Les données de marché sont quant à elles soumises aux facteurs économiques. Toutefois, la préoccupation relative à l'application de molécules dans l'environnement est croissante. C'est pourquoi un cadre national a été fixé lors du Grenelle de l'environnement afin de limiter l'utilisation des produits phytosanitaires tout en continuant d'assurer une protection efficace des cultures. Le plan Ecophyto présenté

en conseil des ministres en septembre 2008, a pour objectif de réduire l'usage des produits phytosanitaires de 50% d'ici 2018. Il vise à renforcer, par la formation, la compétence de l'ensemble des acteurs pour raisonner les interventions phytosanitaires et intégrer tous les moyens de lutte dans la mise en place des stratégies de protection des végétaux

1.4 La diversité des herbicides

Les herbicides sont utilisés pour éliminer les plantes indésirables, appelées adventices, qui poussent en lieu et place des cultures. Ces « mauvaises herbes » peuvent altérer le rendement des plantes cultivées en les privant d'une partie des ressources (eau, éléments nutritifs, lumière, espace). Au delà de la compétition interspécifique, les adventices peuvent également jouer un rôle de réservoir et/ou de plantes relais pour les parasites, maladies et ravageurs, provoquer le bourrage des machines ou déprécier les cultures (renoncules, colchiques et ciguë dans les fourrages secs). De nombreuses voies sont explorées pour limiter l'impact de ces adventices. On estime que 8 à 10% du chiffre d'affaire du marché des phytosanitaires est consacré à la recherche et au développement de nouvelles molécules. D'après les données de l'Union des Industries de la protection de la Plante (UIPP), une moyenne de 10 ans de recherches, représentant 300 études et 200 millions d'euros d'investissement sont nécessaires avant la mise sur le marché d'un produit.

1.4.1 La mise sur le marché des nouvelles molécules

En raison du danger potentiel qu'ils représentent, les produits phytosanitaires sont soumis à une législation stricte. Chaque substance doit suivre une procédure d'homologation avant d'être mise sur le marché.

Dans un premier temps, un dossier relatif à chacune des substances actives est soumis pour être examiné à l'échelle Européenne par le comité phytosanitaire permanent. D'après la directive n° 91/414/CEE du 15 juillet 1991, ce dossier doit rassembler les informations nécessaires pour évaluer les risques prévisibles, immédiats ou différés, que la substance active peut comporter pour l'homme et

l'environnement. Les protocoles normalisés à mettre en œuvre pour évaluer ces risques sont définis par le « Technical Guidance Document » (2003) produit par la Commission des Communautés Européennes (CEE) et l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE). Une classification et un étiquetage pour la substance concernée doivent également être proposés. Si le dossier répond aux exigences, la substance est alors inscrite pour 10 ans sur la liste communautaire des substances actives.

Dans un second temps, c'est le produit phytosanitaire commercial (mélange de substances actives + adjuvant) qui est examiné à l'échelle nationale. Ce deuxième dossier renseigne d'une part sur la toxicité de la formulation pour l'homme et l'environnement, et il évalue d'autre part son efficacité. La commission d'étude de la toxicité est une instance d'experts placée sous la tutelle du Ministère de l'agriculture et de la pêche. Elle s'appuie sur la SSM (Structure Scientifique Mixte), une structure scientifique et technique créée conjointement par l'INRA et le Ministère de l'agriculture et de la pêche. Si le dossier est conforme, une proposition de décision d'AMM est soumise par le comité d'homologation à la décision de la Direction générale de l'alimentation (DGAL) du Ministère chargé de l'agriculture. Actuellement, on compte environ 400 substances actives utilisées en France pour plus de 6 000 préparations commerciales. Un schéma synthétique de la directive 91/414/CE concernant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un produit phytosanitaire est présenté en figure 2.

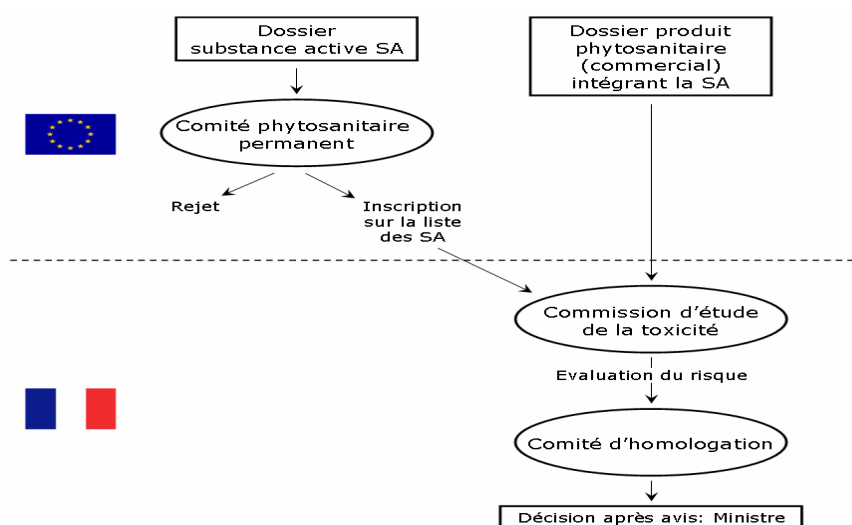


Figure 2 : Schéma synthétique de la directive 91/414/CE concernant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un produit phytosanitaire (Debenest, 2007)

1.4.2 Les différentes familles d'herbicides

Les différentes familles d'herbicides ainsi que leur mode d'action sont récapitulées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales familles d'herbicides et leur mode d'action

Familles d'herbicides	Mode d'action	Molécules principales
Acides phenoxy acétiques	Régulateur de croissance	2,4-D
Acides benzoïques		Dicamba
Acides Pyridine Carboxyliques		Triclopyr
Imidazolinones	Inhibiteur de synthèse des acides aminés	imazapyr, imazaméthabenz nicosulfuron, chlorsulfuron
Sulfonylurées		
Amino-phosphonates	Inhibiteur de synthèse des acides aminés aromatiques	glyphosate
Fops et dims	Inhibiteurs de la synthèse lipidique	quizalofop, sethoxydim
Isoxazolidinone	Inhibiteur des pigments antioxydants	Clomazone
Triazines	Inhibiteur de la photosynthèse	Atrazine, simazine, Linuron, diuron, isoproturon
Urées substituées		
Bipyridilium	Perturbateur des membranes cellulaires	Diquat, paraquat
Diphenylethers		Acifluorfen
Dinitroanilines	Inhibiteur de croissance et de germination	pendimethaline, trifluraline, orysaline
Chloroacetamides		metolachlore, S-metolachlore, acetochlore, alachlore

Au début du XX^{ème} siècle, les herbicides utilisés étaient souvent d'origine minérale (cyanure de calcium, C_2CaN_2 ; sulfate de fer, $FeSO_4$; chlorate de sodium, $NaClO_3$). Actuellement, la très grande majorité des herbicides sur le marché est organique.

Les hormones de croissance synthétiques sont parmi les herbicides les plus utilisés actuellement. Ce sont des herbicides systémiques, absorbés par le feuillage et véhiculés par la sève dans toute la plante. Leur structure mime celle de l'auxine, une hormone naturellement présente dans les plantes. Ces molécules perturbent la régulation hormonale de la division cellulaire ce qui provoque des anomalies de l'élongation des cellules et de la croissance des tissus. Le représentant le plus

ancien et le plus connu de cette famille est le 2,4-D (acide dichloro 2,4 phénoxyacétique), qui faisait partie du tristement célèbre «agent orange » utilisé au cours de la guerre du Vietnam. D'autres molécules ont été synthétisées plus récemment, telles que les acides picoliniques (1963) et des acides quinoléines carboxyliques (1990). Ces herbicides sont sélectifs, ils éliminent les adventices, mais n'ont pas d'effet sur les dicotylédones. Les molécules de cette famille les plus utilisées sont le dichlorprop, le mécoprop, le dicamba et le triclopyr.

Le mécanisme de la photosynthèse est une cible privilégiée pour de nombreux herbicides. Ainsi, deux familles d'herbicides sont utilisées pour leur capacité à perturber le transfert des électrons lors de la photosynthèse : les triazines (simazine, atrazine...) et les urées substituées (diuron, isoproturon, linuron). Ces deux familles de molécules synthétisées dans les années 50-60 pénètrent dans la plante par voie racinaire puis sont transportées via le xylème vers les feuilles où elles se lient avec la protéine D1 du photosystème II. Les molécules de ces familles sont le plus souvent utilisées en prélevée. Elles présentent une persistance moyenne ou grande dans les sols et sont à l'origine d'une contamination importante des eaux (Commissariat Général au Développement Durable, 2010). Ceci a conduit à l'interdiction en France de nombreuses s-triazines en 2001 et 2003. Les Ammoniums Quaternaires (diquat, paraquat, difenzoquat) perturbent le flux d'électrons à la sortie du photosystème I. Ils agissent en interceptant les électrons photosynthétiques, ce qui provoque l'arrêt de l'assimilation de CO₂ et conduit à un transfert de l'énergie vers divers radicaux libres. Le stress oxydatif ainsi induit contribue à provoquer la mort de l'organisme, notamment par le biais de la dégradation des acides gras insaturés des membranes. Ce sont des herbicides non sélectifs, strictement foliaires, et migrant peu. Leur action est dépendante de la présence de lumière. Les plantes traitées par ce type de molécules s'étiolent et se dessèchent rapidement.

D'autres molécules comme les dinitroanilines (pendiméthaline, trifluraline, orysaline) et les carbamates (molinate, thiobencarbe, chlorprophame) agissent en perturbant l'architecture intracellulaire. En induisant des perturbations des microtubules et des centrosomes impliqués dans la division et la structuration de la cellule, elles stoppent la croissance des plantules peu après leur germination. Ces herbicides sont très volatils, peu solubles et facilement photodégradables. Ils doivent donc être incorporés dans le sol avant la mise en place de la culture.

Certains herbicides ciblent quant à eux la synthèse des lipides. Les Fops (diclofop-méthyl) et les Dimes inhibent l'activité acétyl-coenzyme A carboxylase dans les chloroplastes des monocotylédones (Alloxydime-sodium, Clodinafop-propargyl). Cette enzyme est indispensable pour produire le malonyl-CoA, substrat essentiel pour la synthèse des acides gras. Le développement des élongases, chargées de l'allongement des chaînes d'acides gras, peut également être bloqué par les chloroacétanilides (acétochlore, alachlore, métolachlore, S-métolachlore) ou les thiocarbamates (molinate). Les principaux sites d'action de ces dernières familles sont les plastes et le réticulum endoplasmique. Les chloroacétamides regroupent des molécules systémiques préconisées pour le traitement des adventices déjà présentes lors du traitement alors que les thiocarbamates agissent par contact lors de la germination des adventices.

La synthèse d'acides aminés est également la cible de l'action de certains herbicides. Les imidazolinones (imazaméthabenz, imazapyr) sont absorbés par voies foliaire et racinaire. Ils bloquent l'activité de l'enzyme AHAS indispensable à la synthèse de trois acides aminés essentiels : la valine, la leucine et l'isoleucine. De manière comparable, les sulfonilurées (nicosulfuron, chlorsulfuron) migrent dans la plante pour inhiber l'acétolactate synthase, impliquée dans la synthèse des acides aminés ramifiés. Le glyphosate, un herbicide non sélectif, stoppe la croissance des plantes en inhibant l'enzyme 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane). Ces acides aminés jouent un rôle dans la synthèse des hormones végétales, indispensables pour le développement de la plante.

De nouvelles molécules apparues récemment ont un effet indirect. Ainsi, les tricétones (sulcotrione), la callistémone et la clomazone neutralisent les pigments antioxydants tels que les caroténoïdes. En privant les cellules de leur protection vis-à-vis des radicaux libres, elles sont responsables d'un stress oxydatif qui conduit à la destruction de la plante cible.

2. Le devenir des contaminants dans le milieu

2.1 Les facteurs clés

Les phytosanitaires sont appliqués là où leur action est recherchée, donc sur les cultures ou les terres nues. Cependant, leur devenir après l'application est très variable. Celui-ci est soumis à de nombreux facteurs, intrinsèques à la molécule ou liés aux conditions environnementales.

Les herbicides qui ne sont pas absorbés par les plantes cibles peuvent être retenus sur le site ou transportés et/ou dégradés. *In fine*, les molécules appliquées, ou les métabolites issus de leur dégradation, contribuent à la pollution des sols ou des eaux continentales. Le devenir des herbicides dans l'environnement est schématisé par la figure 3.

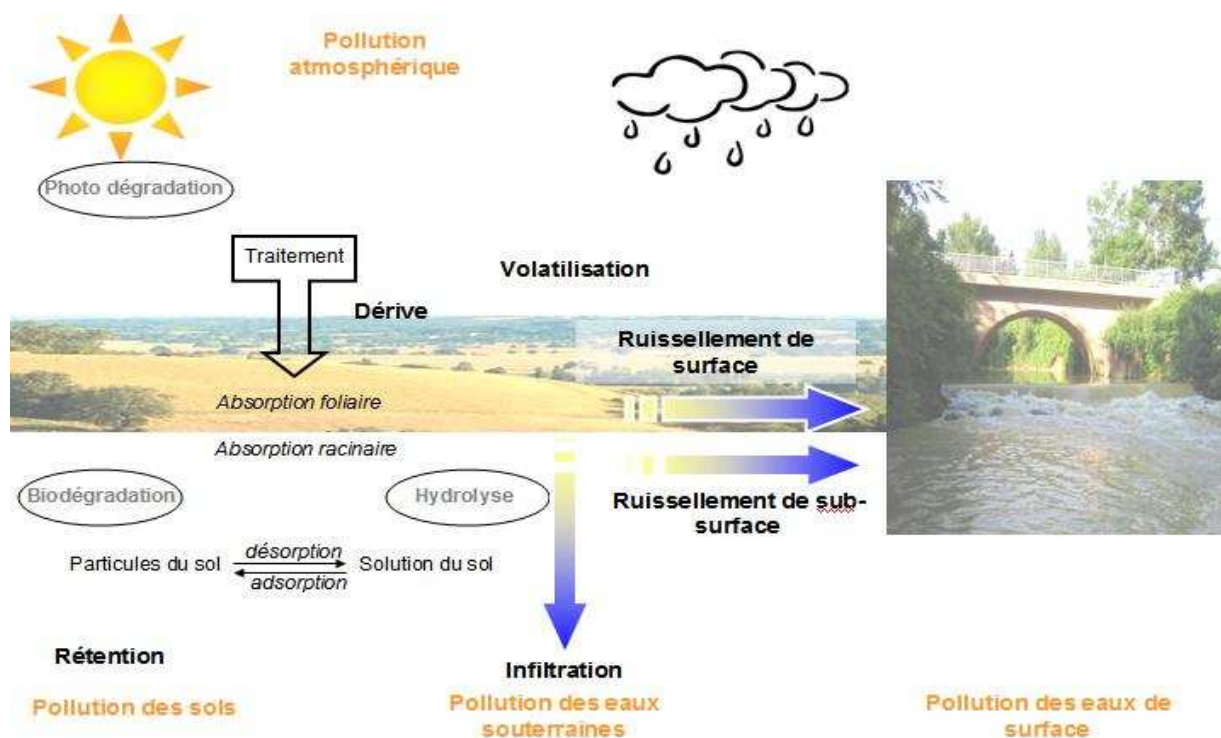


Figure 3 : Devenir dans l'environnement des herbicides appliqués en zones agricoles.

Le tableau 2 expose l'ensemble des processus de transfert et de dégradation susceptibles d'affecter le transfert et le devenir des pesticides organiques.

Tableau 2 : Processus de transfert et de dégradation mis en œuvre dans les mouvements et le devenir des contaminants organiques. (Marathon-Agricultural and environmental consulting, Inc.1992)

Processus	Conséquences	Facteurs impliqués
TRANSFERT		
(processus qui transportent les composés sans altérer leur structure)		
Dérive	Mouvement dus à l'action du vent	Vitesse du vent, taille des gouttes
Volatilisation	Pertes dues à l'évaporation	Pression de vapeur, vitesse du vent, température
Adsorption	Retrait des composés organiques par le biais d'interaction avec les plantes, le sol et les sédiments.	Teneur en argile et en matière organique, type d'argile, humidité
Absorption	Prélèvement des composés organiques par les racines de plantes ou par ingestion	Mécanismes de transport cellulaire, temps de contact
Infiltration	Translocation latérale ou verticale des composés organiques à travers le sol	Teneur en eau, macropores, texture du sol, argile et matière organique
Erosion	Mouvements des composés organiques dus à l'action de l'eau ou du vent	Précipitations, vitesse du vent, diamètre des particules d'argile et de matière organique sur lesquelles sont adsorbées les composés
DEGRADATION		
(processus qui altèrent la structure chimique des composés)		
Photochimique	Dégradation des composés par les rayons du soleil	Structure du composé, intensité et durée de l'exposition aux rayons du soleil
Microbienne	Dégradation des composés par les microorganismes	Facteurs environnementaux (pH, humidité, température), présence de nutriments
Chimique	Altération des composés par des processus chimiques tels que l'hydrolyse ou les réactions d'oxydo-réduction	Mêmes facteurs que la dégradation microbienne, en particulier les pH forts ou faibles
Métabolique	Transformation chimique des composés après l'absorption par un organisme	Capacité à être absorbé, métabolisme de l'organisme, interaction au sein de l'organisme

2.2 La dégradation

A la suite de l'application, les herbicides peuvent être dégradés. Plusieurs processus, biotiques ou abiotiques sont susceptibles d'intervenir. Parmi les processus abiotiques intervenant dans la dégradation des herbicides appliqués dans le milieu, l'**hydrolyse** est le plus important. La molécule appliquée est décomposée grâce aux ions H_3O^+ et HO^- issus de la dissociation de l'eau. Cette réaction est favorisée dans les sols acides ($\text{pH} < 5,5$), à forte teneur en matière organique. Elle peut être catalysée par certaines molécules du sol telles que le Fer III. La **photodégradation** intervient quand les molécules sont exposées aux radiations ultra-violettes du soleil. Les chaînes latérales telles que les chaînes alkyl pour les S-triazines, sont les plus sensibles à ce type de dégradation (Lányi et Dinya, 2005). L'irradiation ultraviolette peut par ailleurs initier l'oxydation des pesticides (Guimont, 2005).

En plus des mécanismes abiotiques, certains processus biologiques contribuent à la dégradation des contaminants. La biodégradation est le plus souvent le fait de micro-organismes, tels que bactéries et champignons qui peuvent dégrader les groupements amides. Ces processus biologiques sont favorisés dans les sols neutres à basiques ($\text{pH} > 5,5$), et sont modulés par la température, les facteurs environnementaux (pédologiques et climatiques) ainsi que la structure de la molécule. Ce type de dégradation expliquerait 50 à 60% de la disparition globale des triazines et des urées substituées dans le milieu (Garmouma et al., 1997).

2.3 Les transferts

2.3.1 La rétention

Lorsque les molécules présentent une grande affinité avec le substrat de surface, celles-ci peuvent former des liaisons avec les particules du sol. Ces liaisons peuvent être uniquement physiques, faisant intervenir les forces de van der Waals, ou chimiques, par le biais d'interactions électrostatiques. Les résidus ne sont alors pas extractibles par les solvants organiques (Bertin et Schiavon, 1989), mais on ne peut exclure leur remobilisation dans les sols (Barriuso et al., 2004). Le degré de liaison dépend des propriétés du sol (nature, granulométrie etc...) et de la molécule

appliquée, telles que la structure moléculaire, la solubilité, la polarité ou la granulométrie. D'un point de vue écotoxicologique, les conséquences de la liaison des contaminants à l'humus sont généralement décrites comme une réduction de la biodisponibilité, une baisse de la toxicité et une immobilisation du composé (Berry et Boyd, 1985 ; Calderbank, 1989 ; Gevao et al., 2000).

2.3.2 Les transferts atmosphériques

Parmi les mécanismes de transfert des pesticides, certains peuvent conduire à une pollution atmosphérique. La dispersion par dérive intervient dès le moment de l'application du phytosanitaire. Son intensité dépend de la taille des gouttelettes appliquées et de la force du vent. Parmi les modes d'épandage utilisés, l'application aérienne est la plus concernée par ce type de transfert. Chaque année en France des pesticides sont appliqués par hélicoptère, avion ou ULM, sur 250 000 hectares de culture, principalement sur les champs de maïs, les vignes et les rizières. La dispersion est plus faible lors des épandages par voie terrestre (tracteurs, pulvérisateurs à dos...), mais non nulle. Après l'application, une fraction des herbicides appliqués peut-être vaporisée. De cette façon, on estime que 15% des herbicides appliqués sur une parcelle sont volatilisés (Gouy et al., 2001). Ce pourcentage est fonction des facteurs environnementaux tels que la température, l'intensité du vent et la pression de vapeur, ainsi que des caractéristiques de la molécule (principalement son poids moléculaire). Les molécules ainsi entraînées par le vent sont alors dégradées par photolyse dans l'atmosphère (ou par l'action des gaz astringents tels que l'ozone), ou dispersées loin de leur site d'application. Elles peuvent alors contribuer à la contamination de milieux éloignés de leur site d'application. La présence d'organochlorés a ainsi été détectée dans les neiges pyrénéennes (Carrera et al., 2001).

2.3.3 Les transferts par l'eau

La cause la plus importante de la dispersion des phytosanitaires dans le milieu est l'entraînement par l'eau. Celui-ci présente trois formes principales: le ruissellement de surface, les écoulements de sub-surface et le transfert vertical des pesticides vers les eaux souterraines (Gouy et al., 2001).

Le transfert des pesticides vers les eaux souterraines est lié au lessivage des produits phytosanitaires depuis les horizons superficiels du sol, non saturés, vers la zone saturée ou aquifère (Colin, 2000). Divers processus sont impliqués, tels que la diffusion dans le sol, la convection et la percolation. La convection concerne principalement la phase liquide, mais peut également intervenir dans la phase gazeuse si le produit est volatil. La percolation (écoulement d'eau dans le sol sous l'effet de la gravité) peut être associée à une lixiviation (dissolution des substances solubles présentes dans le sol). Le transfert vertical est facilité lorsque les molécules sont solubles, hydrophiles et que la forte granulométrie ne favorise pas l'adsorption. Par ailleurs, si des fissures existent et représentent des chemins préférentiels celles-ci peuvent faciliter le drainage de l'eau. De cette façon, un champ dont le labour a déstructuré le sol, éliminant ainsi ces chemins préférentiels, est moins propice aux transports verticaux vers les horizons profonds que ne l'est une prairie (Baker, 1992).

Lors de précipitations importantes, une fraction du volume d'eau ne s'infiltre pas et ruisselle à la surface. Les transferts par ruissellement de surface contribuent à exporter les molécules dissoutes dans l'eau, mais également les molécules les plus hydrophobes, associées aux particules du sol (Léonard, 1990). Le degré d'adsorption dépend de la taille des particules du sol et de la solubilité de la molécule. L'adsorption est favorisée quand les particules du sol sont fines et présentent donc une grande surface spécifique et quand le taux de matière organique du sol est important. En deçà du seuil de solubilité de 2 mg.L^{-1} , les molécules sont essentiellement transportées sous forme particulaire. Au-delà du seuil de 10 mg.L^{-1} , on considère qu'elles le sont en solution (Wauchope et al., 1992). Le transport des contaminants adsorbés est fortement influencé par la taille des particules tant en terme de distance que de « pattern » de déposition (Krein et Schorer, 2000) tandis que le transport des pesticides dissous dans l'eau de ruissellement est lié plus directement au flux d'eau lui même. Dans la mesure où les processus d'érosion favorisent le transfert des contaminants en entraînant les particules du sol, les sols nus, travaillés, apparaissent particulièrement soumis à ce type de transport. Les pratiques visant à limiter l'érosion du sol permettent donc de réduire le transfert de contaminant par ce type de mécanisme.

Les écoulements de sub-surface concernent les écoulements horizontaux intervenant sous la surface du sol. Ils peuvent être naturels, liés à une rupture de perméabilité, ou artificiels dans le cas des sols drainés. Ce type de transport concerne particulièrement les molécules solubles.

2.4 La surveillance de la qualité des eaux de surface

2.4.1 Les réseaux de surveillance

Suite à leur transfert, les herbicides contaminent les milieux aquatiques. Leur concentration dans l'eau est mesurée par un ensemble de réseaux de surveillance dont les données sont synthétisées à l'échelle nationale par le service de l'observation et des statistiques du commissariat général au développement durable (ex IFEN). En 2007, ces réseaux représentaient 2.023 stations réparties sur le territoire français, parmi lesquelles 70% sont liées au programme de la DCE.

Le nombre d'analyses effectuées par an sur chaque station est très variable (de 1 à 25 analyses). Dans le cadre de son rapport de synthèse publié en juillet 2010, le Commissariat Général au Développement Durable n'inclut que les stations pour lesquelles au moins 4 prélèvements ont été effectués sur l'année et au moins 19 pesticides ont été recherchés, incluant 10 pesticides classés comme substances prioritaires et dangereuses au titre des annexes IX et X de la DCE. Après ce filtre, 1 781 stations sont considérées.

2.4.2 Les normes de qualité environnementale

Compte tenu du nombre considérable de stations et de molécules recherchées (453 en 2007), il a été nécessaire de mettre au point une méthode synthétique permettant d'évaluer la qualité globale d'un cours d'eau vis-à-vis de la contamination par les phytosanitaires. Jusqu'à présent, la classification SEQ-Eau servait de grille d'interprétation rapide de la qualité des eaux vis-à-vis des phytosanitaires au regard de la qualité biologique du milieu ou de certains usages comme la production d'eau potable. En bref, on considérait que lorsque aucune molécule n'était quantifiée en concentration supérieure à $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ et que la somme

des concentrations était inférieure à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, la qualité de l'eau était très bonne. A l'inverse, si une molécule était quantifiée au-delà de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ou que la somme des substances était supérieure à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, l'eau était alors considérée comme étant de mauvaise qualité et ne permettant plus la production d'eau potable. Cette grille d'évaluation a été abandonnée afin de s'adapter aux nouveaux critères d'évaluation résultant de la DCE. La qualité de l'eau est dorénavant évaluée au regard de seuil de concentration à respecter par substance ou groupe de substances. Ces normes, dites « normes de qualité environnementale (NQE) » sont spécifiques à chacune des molécules. Elles ont été fixées principalement pour les substances dites prioritaires et dangereuses dans le cadre des annexes IX et X de la directive cadre sur l'eau. De plus, la France a établi des NQE complémentaires pour cinq pesticides. Le tableau 3 présente la liste des pesticides classés en tant que substances prioritaires et pour lesquelles des NQE ont été établies.

Tableau 3 : Liste des pesticides classés en tant que substances prioritaires et les valeurs de NQE ;
H : Herbicide ; I : Insecticide

Pesticides	Usage	Concentration maximale admissible (mg/l)	Seuil en concentration moyenne annuelle (mg/l)
Alachlore	H	0,7	0,3
Atrazine	H	2	0,6
Chlorfenvinphos	I	0,3	0,1
Chlorpyrifos	I	0,1	0,03
Pesticides cyclodiènes	I	-	$\Sigma = 0,01$
DDT total	I	-	$\Sigma = 0,025$
Para-para DDT	I	-	0,01
Diuron	H	1,8	0,2
Endosulfan	I	0,01	0,005
Hexachlorocyclohexane (α , β , γ , δ)	I	$\Sigma = 0,04$	$\Sigma = 0,02$
Isoproturon	H	1	0,3
Simazine	H	4	1
Trifluraline	H	-	0,03
2,4 MCPA	H	-	0,1
Linuron	H	-	1
Chlortoluron	H	-	5
Oxadiazon	H	-	0,75
2,4 D	H	-	1,5

Ces normes sont fixées sur la base de test de toxicité qui ont pour objectif d'estimer les risques liés à l'exposition à une molécule. Afin d'assurer leur standardisation, les protocoles de ces tests sont simples et les paramètres d'expérimentation rigoureusement précisés. Ces tests sont donc mis en œuvre sur

un petit nombre d'espèces, sélectionnées sur des bases pratiques. Deux types de tests peuvent être distingués : les tests de toxicité aiguë et les tests de toxicité chronique. Les tests de toxicité aiguë visent à identifier les doses, concentrations ou concentrations effectives, induisant une mortalité parmi la population exposée. Ainsi, la mesure de CL_{50-96h} consiste à déterminer la concentration de molécules testées qui cause 50% de mortalité parmi un échantillon d'organisme après 96h d'exposition, et la mesure de la TL_{50} consiste à exposer les organismes modèles à une ou plusieurs concentrations, et de mesurer le temps nécessaire pour causer 50% de mortalité. Les tests de toxicité chronique visent à évaluer l'impact d'une exposition longue à une molécule à une concentration sublétales. Le paramètre biologique mesuré n'est plus alors la survie des individus, mais l'appréciation d'effets indésirables sur l'individu, le plus souvent liés à la fitness. On s'intéresse alors aux doses entraînant un effet mesurable sur des paramètres tels que la croissance ou la capacité de reproduction, correspondant à une différence entre un lot exposé et un lot témoin. Les mesures le plus généralement évaluées sont les doses maximales n'entraînant pas d'effet préjudiciable mesurable (NOAEC : No Observed Adverse Effect Concentration), les doses minimales entraînant un effet (LOEC : Lowest Observed Effect Concentration) et plus globalement, les doses entraînant un pourcentage d'effet (ex : la EC20 pour la croissance correspond à la dose entraînant une réduction de 20% de la croissance).

2.4.3 Les bilans de qualité chimique de l'eau

A l'échelle nationale, les quinze molécules les plus fréquemment détectées sont des herbicides (Figure 4), et en particulier les herbicides totaux tels que le glyphosate (et son métabolite l'acide aminométhylphosphonique (AMPA)) et le diuron. Certaines molécules sont encore fréquemment quantifiées bien qu'interdites. Ainsi, l'atrazine est interdite depuis 2003 mais est détectée dans 13,5% des prélèvements où elle est recherchée. Le métolachlore est également interdit depuis 2003. Il a été remplacé par un dérivé isomérique, le S-métolachlore. Certains laboratoires d'analyse ne font pas encore la distinction entre les deux substances et les concentrations observées peuvent donc résulter de la somme des deux produits. Par ailleurs, l'AMPA est le principal produit de dégradation du glyphosate. C'est à ce titre qu'il apparaît dans les analyses de pesticides. Cependant, il faut souligner qu'il

est également utilisé comme additif (phosphonates) de certains détergents et peut ainsi provenir de stations d'épuration urbaines.

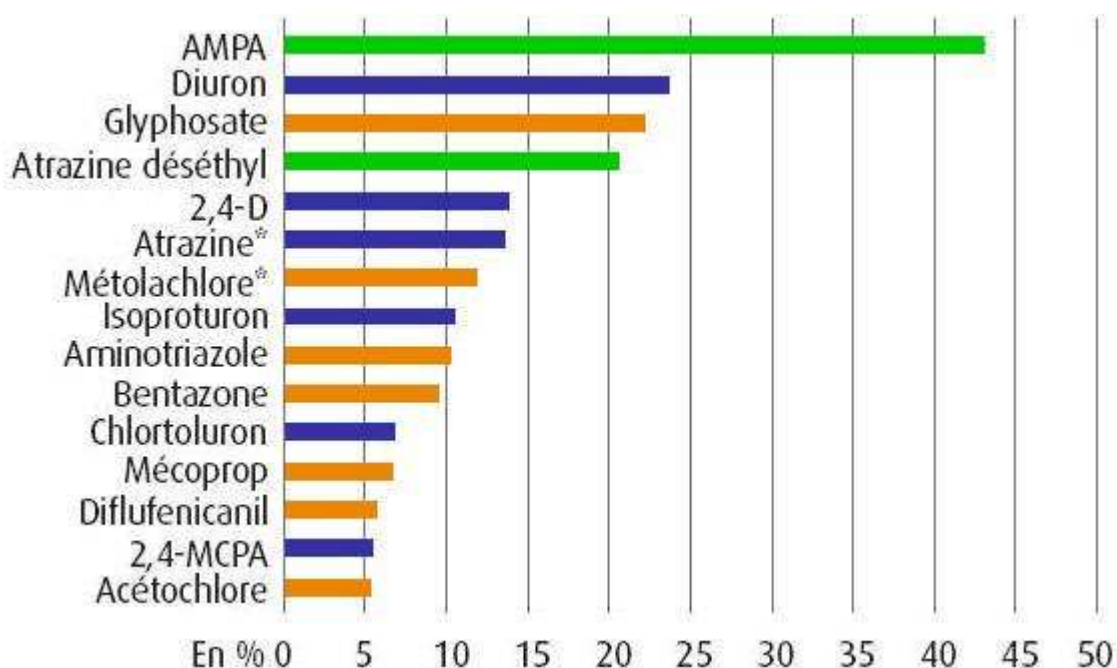


Figure 4 : Palmarès des molécules les plus détectées dans l'eau de surface en France en 2007 (Commissariat général au développement durable, 2010)

Note : * molécules interdites en 2007, les métabolites apparaissent en vert et les substances dotées de NQE en bleu foncé.

Seules six des quinze molécules les plus détectées sont concernées par des normes NQE. Sur la base de ces normes, le diuron, l'isoproturon et l'alachlore sont les herbicides pour lesquels les normes sont le moins respectées.

Ce résultat global ne permet pas de distinguer les hétérogénéités spatiales et temporelles de l'intensité de la contamination. La contamination des eaux par les pesticides est très inégale d'un point de vue géographique. Les régions marquées par une pratique intensive de l'agriculture telles que Midi-Pyrénées et le bassin parisien sont logiquement les plus affectées vis-à-vis de la contamination par les phytosanitaires (Figure 5).

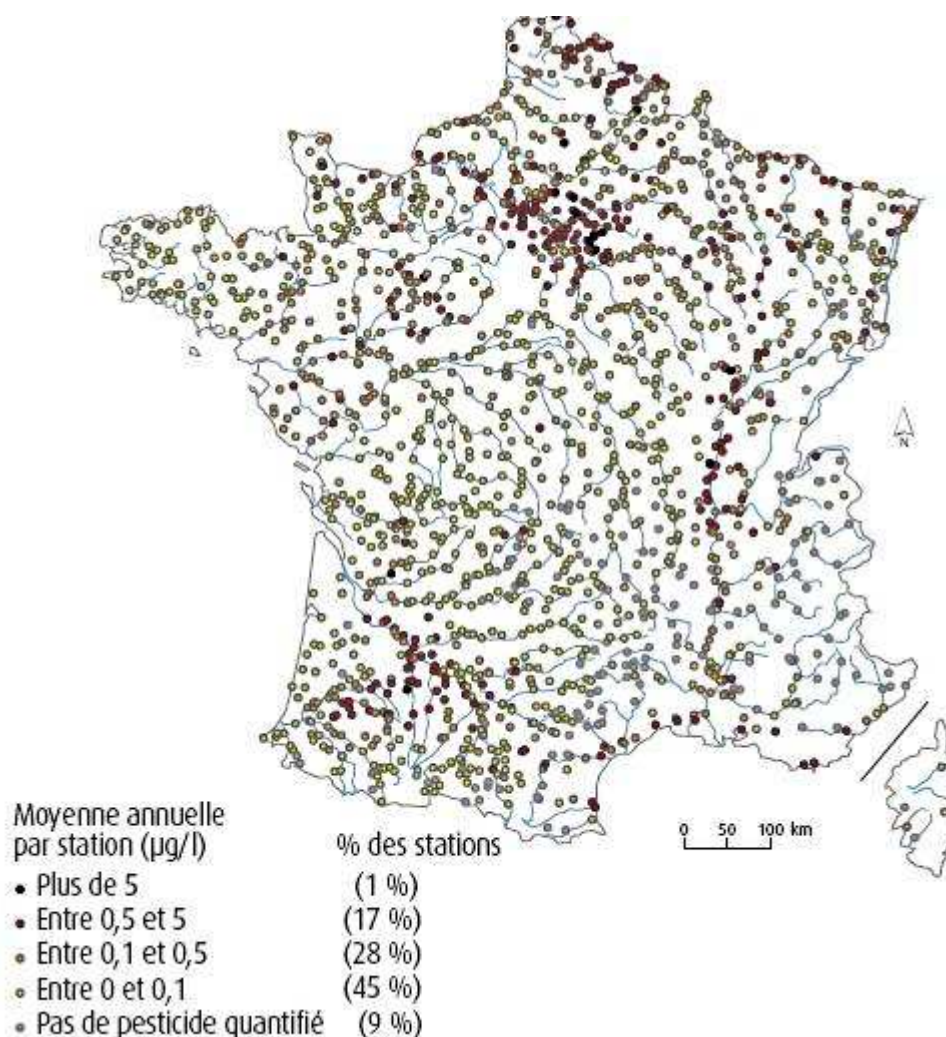


Figure 5 : Carte de répartition de la contamination de l'eau en surface en France – pesticides totaux (Source : Agence de l'Eau, 2007 – MEEDDM, BD Carthage, 2008. Traitement : SOeS, 2009)

Le territoire Gascon est largement exploité pour l'agriculture. On estime que 75% de sa surface est cultivée. Plusieurs études révèlent la contamination de ses cours d'eau par les herbicides. Ainsi, Devault et al., ont mesuré une concentration moyenne d'herbicides de $6,11 \mu\text{g.g}^{-1}$ dans les sédiments du réservoir du barrage de Golfech, situé sur la Garonne, en aval de la confluence de cours d'eau Gascons (Devault et al., 2009). Debenest et al. (2008) relèvent par ailleurs des pics de concentration atteignant $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ lors des épisodes de crue, révélant la forte hétérogénéité temporelle de la contamination. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Taghavi et al. (2010). Au cours de cette étude, une forte hétérogénéité temporelle de la contamination a été mise en évidence. Ainsi, les concentrations d'herbicide mesurées dans l'eau du Montoussé, un affluent de la Save, peuvent être multipliées par 10 lors des épisodes de crues ne durant que quelques heures. Ces résultats mettent en lumière les limites des réseaux étendus de surveillance de la

qualité des eaux qui ne sont pas adaptés pour considérer les événements ponctuels de contamination.

2.5 Le cas particulier des crues

Comme décrit précédemment, le transfert des herbicides depuis les zones où ils sont appliqués vers les écosystèmes aquatiques est associé à de nombreux facteurs environnementaux. Par conséquent, les variations de ceux-ci, associées aux usages discontinus des phytosanitaires, conduisent à une hétérogénéité de la contamination dans le temps. En ce sens, les épisodes de crues représentent des événements propices à un transfert accru des herbicides vers les milieux aquatiques (Thurman et al., 1991).

2.5.1 Les mécanismes impliqués

Les crues interviennent lorsque le volume des précipitations excède les capacités d'absorption du sol. Les volumes d'eau sont alors transférés vers les écosystèmes aquatiques. Les écoulements de surface, hypodermiques et de nappe participent alors au débit des cours d'eau. Le découpage des hydrogrammes de crue permet d'évaluer la contribution de chacun de ces débits (Figure 6).

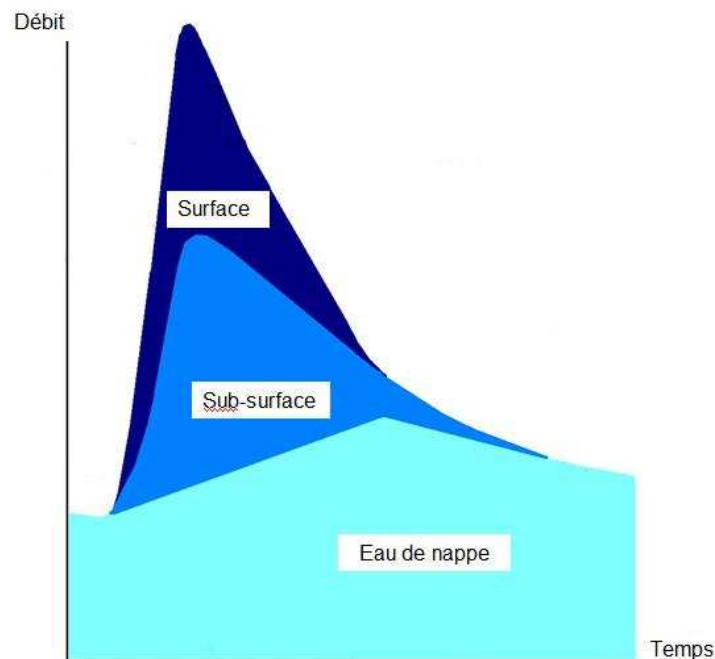


Figure 6 : Contributions des différents écoulements intervenant en période de crue (Taghavi, 2010)

Les écoulements de surface et de sub-surface contribuent à l'essentiel du pic de crue. Ces écoulements participent grandement aux transferts des contaminants (Deletic et Maksimovic, 1998). Les molécules adsorbées sur les particules du sol sont particulièrement exportées via l'écoulement de surface (aclonifen, trifluraline, pendimethaline...), tandis que les transferts liés aux écoulements de sub-surface concernent d'avantage les molécules solubles (métolachlore, metobromuron, metoxuron...) (Taghavi, 2010). La contribution de l'eau de nappe, intervenant en fin de crue, implique les contaminants stockés dans les aquifères. Parmi ces contaminants, il faut noter la prépondérance des produits de dégradation et de certains produits interdits persistants. En 2007, les métabolites représentaient sept des quinze pesticides les plus quantifiés dans les eaux souterraines françaises.

La quantité de produits exportée est étroitement liée au contexte agricole. En effet, l'intensité du couvert de végétation et la nature du sol ont une influence directe sur le devenir des contaminants appliqués, et donc sur la nature des transports. Les sols nus sont donc par exemple particulièrement soumis aux transferts par ruissellement. Par ailleurs, si de faibles précipitations peuvent favoriser la pénétration des molécules dans le sol, des précipitations importantes intervenant rapidement après l'application des pesticides entraînent une exportation importante par le ruissellement de surface (Roth et Helming, 1992). Les crues associées aux orages de printemps, survenant peu après l'application des herbicides de prélevée sur des sols nus sont donc associées à de fortes contaminations.

2.5.2 Les conséquences

Ce phénomène a été identifié comme majeur dans le transfert des contaminants agricoles vers les écosystèmes aquatiques il y a environ 20 ans (Richard et Baker, 1993; Frank et al., 1982), et ce constat est confirmé par des études plus récentes (Guo et al., 2003 ; Bach et al., 2001). Ainsi, Fenelon et Moore (1998) ont décrit que la concentration d'atrazine dans un cours d'eau de l'Indiana bordé de cultures de maïs et soja pouvait passer de l'état de trace en conditions normales à $14 \mu\text{g.l}^{-1}$ pendant les crues de printemps. De la même façon, une augmentation considérable de la contamination (de moins de $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ à plusieurs dizaines de $\mu\text{g.l}^{-1}$) a été mise en évidence sur 9 sites du Mid-West américain lors des

crues de printemps suivant l'application de l'atrazine (Thurman et al., 1992). Dans le sud-ouest de la France, au cours d'une crue de printemps, Taghavi et al., (2010) ont mesuré des concentrations de chlorotoluron et de linuron dix fois supérieures à la contamination chronique. Ces résultats confirment ceux de précédentes études (Debenest et al., 2008 ; Devault et al., 2007).

Les quantités de produits ainsi exportées sur une courte période représentent une part importante des transferts. De cette façon, il a été estimé que 60% de l'atrazine exportée dans les bassins versants du sud de l'Ontario l'étaient par ruissellement au cours des événements de pluie intenses entre janvier et avril (Frank et Sirons, 1979).

En France, 63.000 tonnes de substances actives phytosanitaires ont été appliquées en 2009. A la suite de leur transfert dans le milieu, ces molécules contaminent, parfois sous forme de métabolites, les écosystèmes aquatiques. La contamination chronique des cours d'eau de la région Midi-Pyrénées par les herbicides est mise en évidence par les réseaux de surveillance nationaux. En revanche, en raison de leur courte durée, les transferts massifs de contaminants associés aux crues passent au travers des mailles des réseaux nationaux et ne sont pas considérés dans l'évaluation de la qualité chimique des cours d'eau.

Chapitre 2. Evaluation de l'impact des herbicides sur la qualité biologique des milieux aquatiques

1. Les stratégies d'étude

Les tests normalisés de toxicité, mettant en œuvre des organismes modèles dans des conditions contrôlées, fournissent des outils d'aide à la décision et à la gestion du risque. De part leur haut niveau de standardisation permettant une analyse comparative des résultats, ils représentent des outils réglementaires incontournables. Cependant, dans le cadre d'études environnementales, l'évaluation des dangers et des risques basée sur les tests de toxicité menés en laboratoire n'est pas satisfaisante. En effet, par nature standardisés, les tests à la base de ces décisions sont i) très spécifiques et ii) se déroulent dans des conditions éloignées du milieu naturel. De nombreux facteurs environnementaux biotiques (choix de l'espèce, interactions intra ou interspécifiques) ou abiotiques (température, pH, salinité...), ainsi que les variations temporelles de concentration ou de mélanges de molécules (parfois au dessous des seuils de quantification) sont susceptibles d'influencer la réponse biologique en modifiant la sensibilité des organismes et/ou la biodisponibilité des contaminants. D'autres stratégies d'études existent pour évaluer l'impact toxique des herbicides dans le milieu.

Les conditions de tests en microcosme ou mésocosme peuvent être complexifiées. L'ajout de sédiments ou de contaminants en mélange par exemple peut être utilisé pour s'approcher d'avantages des conditions réelles (Phyu et al, 2006 ; Sorensen et al., 2005). Ces stratégies d'exposition sont d'avantages destinées à tester l'influence de chacun des paramètres plutôt qu'à reconstituer de véritables conditions environnementales.

Une autre stratégie d'exposition se base sur le prélèvement d'échantillons d'eau depuis le milieu auquel sont exposés les organismes au laboratoire. Ce type d'expérimentation permet ainsi d'exposer les organismes aux mélanges chimiques réels tels qu'ils existent dans le milieu, et offre un contrôle de tous les autres paramètres (da Silva Souza et Fontanetti, 2006; Lemos et al., 2007). Cette méthode implique néanmoins le prélèvement des échantillons, qui doit être le plus

représentatif possible, leur manipulation, leur stockage et éventuellement leur conservation (ex : congélation...). Ceci implique de nouvelles sources de variations potentielles par rapport aux conditions environnementales.

Afin d'intégrer toute la complexité du milieu, une autre approche consiste à étudier des organismes qui y sont réellement exposés. Pour cela, les organismes sont maintenus encagés (Whitehead et al., 2004 ; Burton et al. 2005 ; Oikari, 2006 ; Bony et al., 2008). Il est ainsi possible d'exposer des individus homogènes (en terme de provenance, d'âge, taille, sexe...) en maîtrisant la durée d'exposition tout en considérant l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques réelles du milieu et les flux de contaminants.

Enfin, les mesures peuvent être effectuées sur des individus prélevés sur le terrain. Cependant les organismes mobiles sont susceptibles de se déplacer dans un environnement hétérogène en terme de contamination. Il est alors délicat d'attribuer les effets mesurés à telle ou telle autre condition d'exposition. De plus, le suivi de certains biomarqueurs tels que la survie, le potentiel de reproduction ou la croissance ne peuvent être mesurés directement.

2. Effets des herbicides sur les poissons

2.1 Les biomarqueurs

Afin de répondre au besoin d'évaluation de l'impact biologique des contaminations, des outils de diagnostic ont été développés. Les biomarqueurs sont définis comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997). Par définition, ils visent donc à appréhender la contamination dans le contexte biologique.

De nombreuses mesures biologiques peuvent être modifiées par l'exposition à un contaminant. Pour qu'une mesure biologique puisse être interprétable au regard d'une perturbation, il doit être possible de discriminer une réponse à un stress

anthropogénique d'une modulation associée à un statut physiologique et/ou aux conditions environnementales. C'est pourquoi les facteurs internes (âge, sexe, statut reproducteur etc..) pouvant moduler la réponse doivent être connus ou maîtrisés en conditions expérimentales, afin de pouvoir discriminer les valeurs sortant du domaine normal de l'homéostasie. Il est en effet important de considérer comme une réponse uniquement la cascade enclenchée par la perturbation, et non les oscillations normales. Par ailleurs, l'amplitude de la variabilité naturelle du biomarqueur doit être connue et aussi faible que possible, afin que sa sensibilité permette de révéler des impacts précoces à des concentrations sub-toxiques. La différence entre les oscillations naturelles des biomarqueurs et les signaux de réponses à un stress est illustrée dans la figure 7. Cette figure présente également le pouvoir de détection précoce des biomarqueurs, en amont des effets délétères.

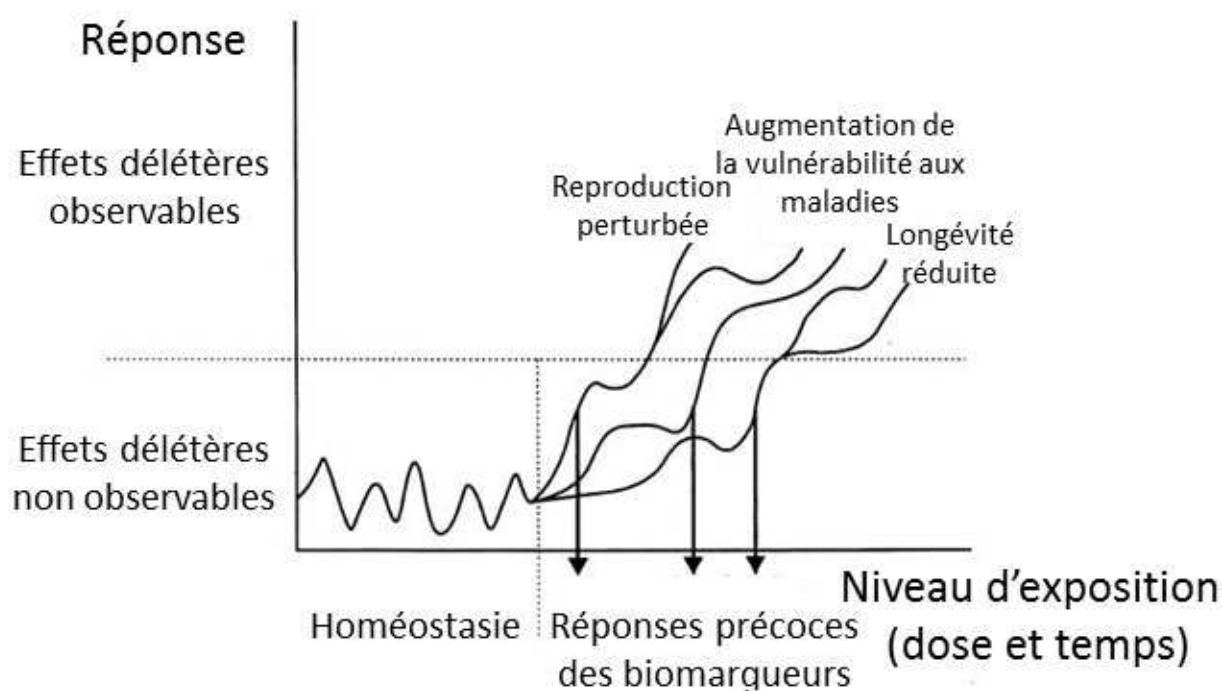


Figure 7 : Schéma de réponse des organismes aux effets délétères d'une exposition à un polluant
D'après Van der Oost et al., 2003)

A l'heure actuelle, aucun biomarqueur n'a été identifié comme étant spécifique des herbicides comme peuvent l'être les métallothionéines pour les métaux. En raison de la très grande variété de molécules, et de la diversité des effets potentiels et des modes d'action, de nombreuses mesures biologiques, relatives à l'ensemble des échelles biologiques, sont utilisées en tant que biomarqueur pour évaluer les effets des herbicides sur les poissons.

2.2 A l'échelle cellulaire

2.2.1 Protéines inductibles

Afin de préserver l'intégrité des organismes, de nombreux mécanismes de protection peuvent être mis en œuvre afin de faire face à une contamination. Les biomarqueurs chimiques les plus précoces sont souvent ceux liés aux mécanismes de défense induits par l'organisme. Les métallothionéines sont fréquemment utilisées chez le poisson comme biomarqueurs de contamination métallique, mais ne sont pas associées à la contamination par herbicides. Les herbicides sont des substrats des protéines de résistance aux multixénobiotiques (MRP1) (Leslie et al., 2001). Ces protéines transmembranaires qui expulsent les contaminants en dehors des cellules sont largement répandues chez les organismes aquatiques (Bard, 2000). Elles ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces de poissons comme la carpe, le turbot, le flet (Smital et Sauerborn, 2002; Tutundjian et al., 2002; Koehler et al., 2004). Par ailleurs, une étude a mis en évidence l'induction d'une protéine de stress (HSP70) chez *Oreochromis niloticus* exposé à un herbicide (Oxyfluorfen) (Hassanein et al., 1999).

Cependant, les biomarqueurs les plus souvent utilisés chez les poissons pour détecter précocement une exposition ou un impact liés aux herbicides sont associés aux mécanismes de détoxification. De manière générale, la présence de xénobiotiques dans les cellules conduit à l'activation des systèmes biochimiques de détoxification. Deux phases peuvent être distinguées dans ce processus qui vise à expulser les contaminants hors des cellules. La phase de fonctionnalisation (Phase I), consiste à oxyder le substrat, souvent par le biais du cytochrome P450. La phase de conjugaison (Phase II) lie une molécule endogène très polaire au substrat oxydé afin de faciliter son expulsion. Ces biomarqueurs sont souvent considérés comme des biomarqueurs d'exposition. Cependant, l'impact de la mobilisation de tels mécanismes n'est pas nul. En effet, l'activation de ces mécanismes de défense modifie les allocations d'énergie des organismes exposés. Ceci peut entraîner des délais de croissance et affecter les individus dans leurs interactions intra et interspécifiques, et par conséquent avoir des impacts néfastes aux échelles biologiques supérieures (Wiegand et al., 2000).

L'induction des mécanismes de phase I de détoxification est souvent mesurée par l'intermédiaire de l'activité enzymatique ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) (Goksøyr et Förlin, 1992). Ce biomarqueur est régulièrement utilisé chez les poissons pour évaluer la présence de certains polluants (HAP, PCB et dioxines) dans le milieu. Les études utilisant la mesure de l'activité EROD dans le cas d'expositions aux herbicides sont rares. Mikula et al. (2008), ont constaté une augmentation de l'activité EROD chez des carpes exposées 28 jours à une formulation commerciale d'alachlor. L'atout principal de ce biomarqueur est sa grande sensibilité. En revanche, dans la mesure où certains xénobiotiques (organotines) sont susceptibles d'inhiber l'activité CYP1A, l'interprétation de résultats négatifs doit être menée avec précautions (Brüschweiler et al., 1996).

La phase II de détoxification met notamment en jeu des enzymes qui ont pour fonction de conjuguer une molécule de glutathion (GSH) à un large spectre de substrats électrophiles (R), endogènes ou exogènes (dont les herbicides). Le complexe R-SG est ensuite expulsé hors de la cellule. Les glutathions S-transférases (GST) sont les principales enzymes de la phase II. Elles ont été mises en évidence dans la plupart des organismes, depuis les plantes (Oztetik, 2008) jusqu'aux mammifères (Hayes et al., 2005). Le rôle de ce type de mécanisme de défense face aux herbicides a été clairement mis en évidence chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) (Pena-Llopis et al. 2001). Cette étude a démontré que la survie des individus exposés au molinate (41,8 mg.L⁻¹) dépendait de leur capacité à induire l'activité glutathion-reductase. La perte de l'équilibre entre le glutathion réduit et oxydé entraînant la mort des individus. De la même façon, Modesto et Martinez (2010) ont démontré une induction de la GSH et de la GST chez *Prochilodus lienatus* à la suite d'une exposition au glyphosate. Chez les embryons de poissons-zèbre, il a été démontré qu'au-delà d'une concentration de 5 mg.L⁻¹ d'atrazine, l'activité GST diminue et le développement est perturbé (Wiegand et al., 2000). Une modulation de l'activité des enzymes de phase II a également été mise en évidence chez *Clarias gariepinus* à la suite d'une exposition courte au butachlore (Farombi et al., 2008). Les niveaux de glutathion et de l'activité glutathione-S-transferase sont augmentés dans le foie et réduits dans les reins, les branchies et le cœur. Une inhibition de l'activité glutathion transferase a également été mise en évidence dans les cellules hépatiques d'anguille (*Anguilla anguilla*) exposées à de l'atrazine (Carletti et al.,

2008). Afin d'augmenter la sensibilité de ce type de réponse, les travaux récents visent à mesurer l'activité d'isoformes spécifiques de GST et des Uridine Diphosphate Glucuronyltransferase (UDPGT), qui sont des indicateurs plus sensibles que la mesure de l'activité totale. De plus, dans le cadre de la biosurveillance environnementale, des travaux visent à utiliser un biomarqueurs composite, le BTI (biotransformation Index), qui reflète le rapport entre les activités de phase I et II de détoxification (Van der Oost,1998).

2.2.2 Les mécanismes de défense antioxydants

Le mécanisme de défense antioxydant est également utilisé comme support d'études de biomarqueurs. Le métabolisme aérobie induit en permanence la formation de radicaux libres (molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés). Cette production est compensée par des mécanismes antioxydants, maintenant l'homéostasie redox. Ces mécanismes sont répartis en deux classes illustrées sur la figure 8 : les systèmes de défense enzymatiques (Super-oxyde dismutase, catalase et glutathione peroxydase) et non-enzymatiques (glutathion, vitamine E, ascorbate, β -carotène, et urate). Lorsqu'un déséquilibre se crée entre la production et la neutralisation des radicaux libres, l'organisme est soumis à un stress oxydatif. Les radicaux libres tendent en effet à se stabiliser en arrachant les électrons nécessaires à leur stabilité aux molécules présentes dans la cellule. Lipides, protéines et acides nucléiques sont alors susceptibles d'être altérés, mettant ainsi en jeu l'intégrité des cellules.

La présence d'un contaminant est susceptible de modifier l'équilibre oxydant, directement ou par le biais des processus de détoxification. De cette façon, une modulation des mécanismes de défenses et/ou des impacts associés au stress oxydant peuvent révéler l'exposition des poissons aux herbicides. De part leur caractère non spécifique, les biomarqueurs de stress oxydatif peuvent être utilisés comme indicateurs globaux de l'état de pollution (Cossu et al.,2000).

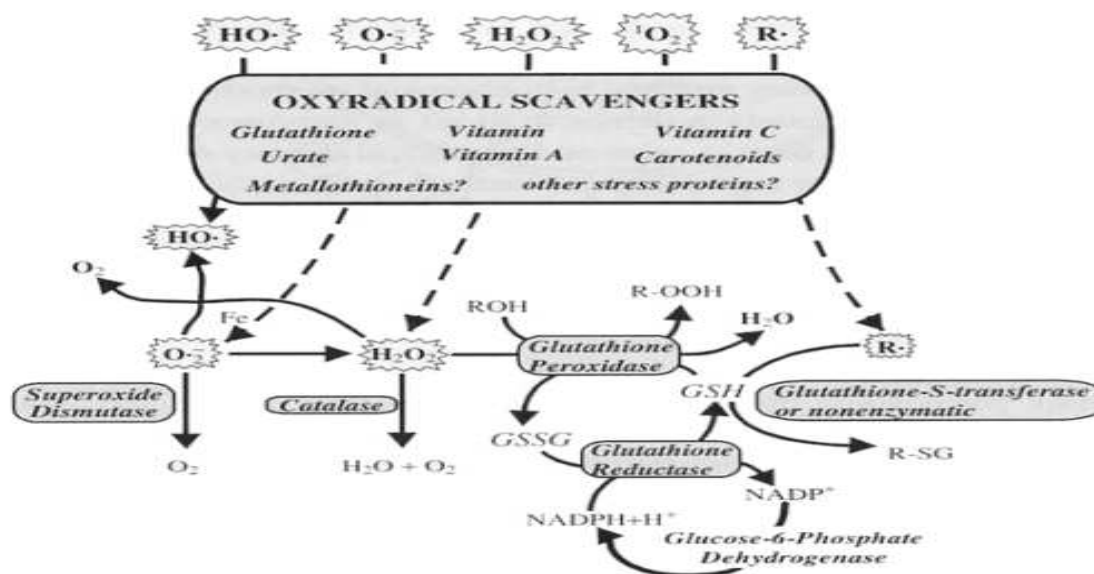


Figure 8 : Rôle des enzymes antioxydantes dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. (Cajaraville et al., 2003 dans Larno, 2004).

Ces systèmes fonctionnant en permanence, ils sont rapidement induits quand l'équilibre oxydatif est rompu. Ces biomarqueurs permettent donc une détection précoce de l'exposition des organismes à un stress, avant même que l'intégrité de la cellule ne soit altérée. En revanche, en raison du grand nombre de perturbations pouvant moduler le statut oxydant, il est difficile d'établir une relation entre la nature de la perturbation et l'effet mesuré. Plusieurs études expérimentales ont néanmoins pu associer une activation de ce système avec l'exposition des poissons à des herbicides. Yi et al. (2007) ont démontré une induction de l'activité catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD) chez le carassin en réponse à une exposition à l'alachlore. Le rôle des SOD est de catalyser la transformation des superoxydes en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire (O_2), les CAT intervenant ensuite pour catalyser la réduction du H_2O_2 en eau et en O_2 (figure 8). Cette même étude a mis en évidence l'induction d'enzyme de phase II de détoxification, les Glutathion-S-transférases. Fatima et al. (2007) ont mis en évidence le même type de réponse chez des carassins dorés (*C. auratus*) exposés à un mélange d'herbicides (atrazine, simazine, isoproturon et diuron). Une augmentation de l'activité SOD a été mesurée dans la rate et le foie. En revanche, après 8 semaines l'activité CAT est significativement réduite dans ces mêmes organes et dans les reins (Fatima et al., 2007). Cette diminution du niveau d'activité révèle un impact délétère du stress oxydant. Cette réponse peut donc être considérée comme un biomarqueur d'effet.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Farombi et al., (2008). Chez des individus de *Clarias gariepinus* exposés au butachlore pendant 24h, les activités SOD et CAT sont augmentées dans le foie et les reins, mais réduites dans les branchies et le cœur. Lorsque les mécanismes de défense sont saturés, ils ne permettent plus d'équilibrer le stress oxydatif, et l'intégrité des cellules ne peut plus être garantie. Des dégâts peuvent être constatés sur trois cibles principales : les lipides, les acides nucléiques et les protéines.

2.2.3 Peroxydation lipidique

Les membranes lipidiques sont particulièrement affectées en cas de stress oxydatif. En raison de leurs doubles liaisons, les acides gras polyinsaturés sont particulièrement sensibles à la peroxydation. En effet, quand un lipide polyinsaturé est oxydé, la formation du radical peroxyde lipidique qui en résulte peut à son tour oxyder une nouvelle chaîne non saturée et propager la réaction (figure 9).

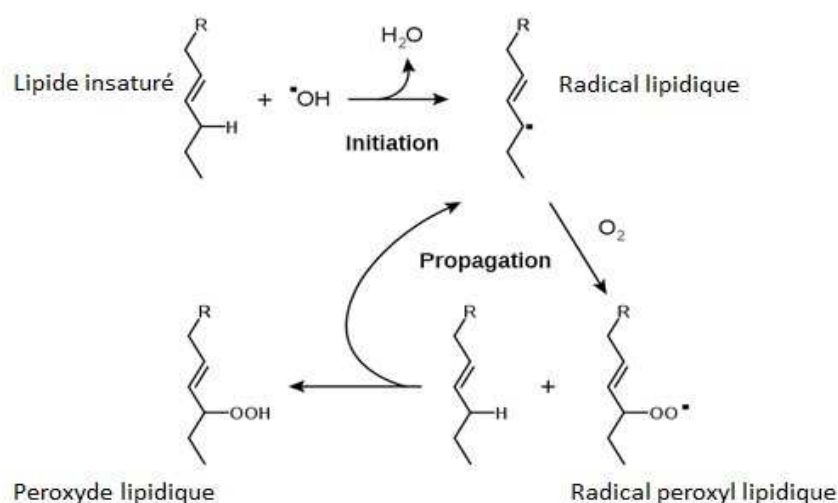


Figure 9 : Séquence de réaction de peroxydation lipidique (Vickers, d'après Young et McEneny, 2001)

Les membranes peroxydées perdent leur fluidité et leur perméabilité. De plus la plupart des produits de la lipopéroxydation (radicaux alkoxyl, aldéhyde, alcanes, époxyde et alcools) sont toxiques et certains sont mutagènes. Ils peuvent former des adduits à l'ADN. La peroxydation des lipides est généralement évaluée par le biais de produits intermédiaires. Le dosage des substances réagissant avec l'acide

thiobarbiturique (TBARs), permet d'estimer la formation de malondialdéhyde (MDA), un produit secondaire de la peroxydation lipidique.

Plusieurs études ont mis en évidence une peroxydation lipidique chez des poissons exposés aux herbicides. Deux études différentes ont mesuré une augmentation des niveaux de TBARs dans le foie de poissons exposés 30 jours ou 192 heures à la clomazone (Moraes et al., 2009, Crestani et al. 2007). Le même résultat est mesuré sur des poissons exposés 30 jours à du propanil, herbicide largement utilisé aux Etats-Unis. A l'inverse, une baisse des niveaux de TBARS a été mesurée chez les poissons exposés au quinclorac (herbicide auxinique), propanil (acetanilide) et metsulfuron methyl (sulfonylurée) (Moraes et al., 2007). Une augmentation de la formation de MDA a également été mise en évidence dans les cellules hépatiques de *Micropogonias undulatus* à la suite d'une exposition à l'arochlor (Thomas et Wofford, 1993) et dans les foies, reins, branchies et cœurs de *Clarias gariepinus* exposés au butachlor (Farombi et al., 2008).

2.2.4 Biomarqueurs de génotoxicité

En cas de stress oxydatif, les acides nucléiques peuvent également être endommagés. L'attaque des radicaux ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut provoquer différents types de dommages, tels que des cassures de brins, des liaisons inter-brins et entre ADN et protéines, la formation de sites apuriniques/apyrimidiques et des modifications de bases (Halliwell, 1993). Dizdaroglu (1993) a identifié plus de 100 produits différents résultant de dommages à l'ADN causés par des espèces réactives de l'oxygène. Dans le cadre d'une approche par biomarqueur, l'oxydation de l'ADN est le plus souvent évaluée en mesurant les niveaux de 8-Oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) dans les cellules. C'est un produit ubiquiste de l'oxydation de l'ADN par les ROS telles que $\cdot\text{OH}$, l'oxygène singulet et les oxydants à un électron (Cadet et al., 1997). Sa présence est souvent considérée comme l'empreinte des attaques oxydantes sur l'ADN (Dizdaroglu et al. 1991). Toutefois, elle ne peut pas être interprétée comme une donnée quantitative des dommages à l'ADN (Halliwell, 1993). La présence de 8-oxo-dG dans une molécule d'ADN est susceptible de perturber sa réplication et d'induire des mutations de types transversions GC-TA (Kasai, 1997). Il existe assez peu d'études mettant en évidence une augmentation de la 8-oxodG chez le poisson à la suite d'exposition aux

herbicides. Ce type d'impact a été mis en évidence dans les cellules branchiales de *Sparus aurata* exposées au paraquat pendant 8 et 24 heures. En revanche, après 48h d'exposition, les poissons exposés présentaient des taux de 8-oxodG inférieurs aux individus contrôles, ce qui laisse suspecter l'intervention de mécanismes de réparation de l'ADN (Rodriguez ariza et al., 1999). En dehors du dosage de la 8-oxodG, caractéristique de l'altération de l'ADN par un stress oxydant, d'autres types d'altérations de l'ADN par les herbicides ont été mis en évidence.

L'exposition aux herbicides peut notamment entraîner des cassures des brins de l'ADN. La mesure de l'intensité des cassures de brins peut-être utilisée pour rendre compte de la génotoxicité d'une contamination. Ainsi, la génotoxicité de l'atrazine et de l'alachlore a été mise en évidence chez les poissons au moyen de l'essai comète (Chang et al., 2005 ; Zhu et al., 2010). Dans la limite des doses écologiquement pertinentes, (< 100ppm), un effet dose a été constaté. Ce test est souvent complété par le test des micronoyaux (MN), qui reflète des dégâts non réparables. Grisolia (2002) a démontré la pertinence de l'utilisation de tels tests de génotoxicité chez les poissons. En effet, une induction de MN a pu être mesurée dans les érythrocytes de *Tilapia rendalii* à la suite d'une exposition au glyphosate et imazapyr alors que des souris testées en parallèle n'ont pas montré de tels résultats. De Campos Ventura et al. (2008) ont mis en évidence des dégâts consécutifs à une exposition de 72h à des concentrations réalistes d'atrazine (6,25 à 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) en utilisant conjointement ces deux tests chez *Oreochromis niloticus*. Cavas et Konen (2007) ont également mis en évidence les deux types de dommages à l'ADN chez des carassins, *C. carassius*, exposés au glyphosate (5 à 15 mg.L^{-1}). De la même façon, l'impact génotoxique du 2,4D et du butachlore sur les poissons a également été démontré par les tests comète (Ateeq et al., 2006) et MN (Ateeq et al., 2002). En revanche, une étude sur *Prochilodus lineatus* a montré qu'une exposition aiguë au glyphosate entraînait des dégâts détectables en essai comète, mais pas d'induction de MN (Cavalcante, 2008). Les travaux portant sur l'étude de l'impact génotoxique des herbicides en milieu naturel sont relativement rares. Whitehead et al., (2004) ont mis en évidence le potentiel génotoxique de l'eau des rivières situées en zone agricole en utilisant le test comète pour les poissons (*Catostomus occidentalis*) et le test d'Ames sur *Salmonella*. Enfin Bony et al, (2008) ont révélé la génotoxicité des

flashs de contamination de mélange agricole en exposant des poissons en cage directement dans le cours d'eau.

2.3 A l'échelle individuelle (Biomarqueurs Physiologiques)

2.3.1 Neurotoxicité (AChE)

L'Acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh), le neuromédiateur permettant l'arrêt du signal nerveux chez les vertébrés. L'inhibition de son activité est susceptible d'affecter la fitness des individus exposés par le biais de réduction de la croissance, de la survie ou des capacités de reproduction (Dutta et Arends, 2003). Le système nerveux est une cible privilégiée pour les insecticides. Ainsi de nombreux travaux visent à évaluer l'effet des ces molécules dans l'environnement et utilisent la mesure de l'activité AChE en tant que biomarqueur d'exposition à un contaminant neurotoxique (voir Fulton et Key, 2001, pour une revue). Certaines études ont par ailleurs démontré un impact des herbicides sur l'activité AChE chez le poisson.

De manière générale, les poissons exposés présentent une inhibition de l'activité AChE dans le cerveau, mais celle-ci est variable selon les espèces. L'exposition à une même dose d'oxyfluorfen, un herbicide à spectre large, entraîne par exemple une baisse de l'activité AChE 3 fois plus forte chez *O. niloticus* que chez *G. affinis* (Hassanein, 2002). L'impact du diuron et du nicosulfuron a été testé sur *C. carassius*. Ces deux molécules inhibent l'activité AChE dans le cerveau, dès 2h d'exposition à 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et après 24h à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le nicosulfuron (Bretaud et al., 2000). L'activité peut être inhibée dans d'autres organes que le cerveau. Ainsi, chez des anguilles exposées au thiobencarb ou au diazinon, l'inhibition de l'activité AChE a pu être mesurée dans l'œil, le cerveau, les branchies ou le plasma (Sancho et al., 2000 ; Fernandez-Vega et al., 2002 ; Ceron et al., 1996). Dès 2 heures d'exposition à des doses sublétales de thiobencarb, l'activité AChE est diminuée de moitié dans les muscles et de 30-40% dans les branchies. Cette inhibition est réversible. A la suite d'une exposition de 4 jours, les taux d'activité AChE sont restaurés dans un délai de 8 jours (Fernandez-Vega et al., 2002).

Parmi les herbicides testés, le glyphosate a été l'objet d'un grand nombre d'études. Ainsi, il a été démontré qu'une exposition sur 96h induisait une inhibition de

l'activité AChE dans le cerveau des poissons (Glusczak et al., 2006 ; Glusczak et al., 2007 ; Modesto et Martinez., 2010). Dans les muscles, une inhibition a été constatée chez *Prochilodus lineatus* (Modesto et Martinez, 2010) mais pas chez *Leporinus obtusidens* (Glusczak et al., 2006) ni *Rhamdia quelen* (Glusczak et al., 2007). Lors d'une exposition plus longue (90 jours), la diminution de l'activité AChE est mise en évidence dans le cerveau, mais pas dans les muscles de *Leporinus obtusidens* (Salbego et al., 2010). L'activité AChE est également perturbée par l'exposition au 2,4D. Plusieurs doses ont été testées dans le cadre d'expositions courtes (96h). A une concentration de 1 mg.L⁻¹ dans les muscles et de 10 mg.L⁻¹ dans le cerveau, l'activité est inhibée (da Fonseca et al., 2008). A forte dose, 600 et 700 mg.L⁻¹, l'activité AChE est augmentée dans le cerveau (Cattaneo et al., 2008)

L'impact neurotoxique des herbicides utilisés en riziculture (clomazone, quinclorac et le metsulfuron methyl) a également été largement étudiés. Miron et al. (2005) ont mis en évidence une inhibition de l'activité AChE dans le cerveau et les muscles de *Rhamdia quelen* exposés à la clomazone. Les effets du quinclorac et du metsulfuron methyl sont comparables dans les muscles où elles induisent une inhibition de l'activité. En revanche, ces deux molécules induisent une augmentation de l'activité AChE dans le cerveau (Miron et al., 2005). Dans une autre étude, Miron et al. (2008) ont démontré qu'une exposition à la clomazone (1/10 LC-50), réduisait plus rapidement l'activité AChE dans le cerveau et le cœur que dans les muscles (96h contre 192h). Les temps de récupération diffèrent également selon les tissus. Après 192h de récupération, l'activité AChE est rétablie dans le cœur, mais demeure basse dans le cerveau et les muscles. L'inhibition de l'activité AChE dans le cerveau de poissons exposés à la clomazone, au quinclorac ou au propanil a été confirmée par d'autres études (Moraes et al., 2007 ; Moraes et al., 2009). Ces études ont par ailleurs démontré que l'activité dans les muscles pouvait être augmentée par une exposition de 30 jours (0,5 mg.L⁻¹ ou propanil 3,6 mg.L⁻¹) (Moraes et al., 2007) ou diminuée par une exposition de 90 jours à des concentrations comparables (clomazone 376 µg.L⁻¹ ou propanil 1644 µg.L⁻¹) (Moraes et al., 2009).

2.3.2 Endocrinologie

Le système endocrinien des organismes exposés peut également être la cible des herbicides. Le stress provoqué par l'exposition aux contaminants peut induire

une augmentation de la production de cortisol. Ce phénomène a été mis en évidence à la suite d'une exposition au glyphosate (Soso et al., 2007) et à un mélange de triazines (atrazine et simazine) (Cericato et al., 2008). Les résultats de cette dernière étude révèlent par ailleurs que l'élévation du taux de cortisol induite par l'exposition aux herbicides ne permet plus à l'organisme de répondre de manière adéquate à un stress supplémentaire. L'impact d'une exposition à l'atrazine sur les concentrations en cortisol chez le poisson a été examiné à deux reprises conjointement avec un stress salin. Waring et Moore (2004) ont mis en évidence une augmentation significative du taux de cortisol chez des smolts confrontés à de l'eau de mer après avoir été exposés à de l'atrazine. Ceci compromet donc leur survie lors de cette phase de leur cycle de vie. A l'inverse, pour une exposition à une gamme de concentrations d'atrazine similaire, aucune élévation significative du taux de cortisol n'est détecté chez des *Fundulus heteroclitus* dans différentes conditions de salinité (Fortin et al., 2008). Dans les deux cas, une altération de l'équilibre osmotique est cependant constatée.

Les effets perturbateurs endocriniens de l'atrazine ont été particulièrement documentés chez les amphibiens. Hayes et al. (2002) ont ainsi démontré que l'atrazine induisait l'activité aromatasase, ce qui a pour conséquence d'augmenter la conversion de testostérone en œstrogènes. Les individus mâles sont alors démasculinisés, ce qui est suspecté de jouer un rôle important dans le déclin global des populations. Chez les poissons, cet impact est plus discuté. Ainsi, Suzawa et Ingraham (2008), ont mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes codant pour l'aromatasase chez *D.rerio* exposé à l'atrazine. De la même façon, des carassins exposés à l'atrazine présentent une augmentation de la concentration en 7β -œstradiol, et une baisse de testostérone et 11-ketotestosterone (Spanò et al., 2004). Ceci est en accord avec les conséquences attendues d'une induction de l'activité aromatasase. Néanmoins, une étude ultérieure de la même équipe a conduit à nuancer la baisse de 11-ketotestosterone et à exclure un impact sur l'aromatasase (Nadzialek et al., 2008).

Les perturbations endocriniennes sont également examinées par l'intermédiaire du dosage en vitellogénine. La production de cette lipoprotéine étant induite par les œstrogènes, sa quantification est admise comme un outil pour évaluer l'exposition à des composés œstrogéniques (Scholz et Mayer, 2008). La revue de

Rohr et MacCoy (2010) recense quatre études visant à rechercher un effet de l'atrazine sur les concentrations de vitellogenine chez le poisson. Aucune d'entre elles n'a mis en évidence un impact significatif. En revanche une induction de vitellogenine a été mise en évidence chez des poissons-zèbres (*Danio rerio*) exposés à trois concentrations (0,1, 1 et 5 mg.L⁻¹) d'une solution commerciale contenant du metazachlor (Butisan 400 SC ; 35.6% (w/w) metazachlor) (Jurcikova et al., 2007). Le caractère xénoœstrogénique de l'oryzaline a de plus été clairement démontré par des tests *in vitro* et *in vivo* chez le Medaka (Hall et al., 2005 ; Hall et al., 2007).

2.3.3 Immunologie

Les défenses immunitaires peuvent également être affectées par une exposition aux herbicides. Ainsi, une atrophie des organes lymphoïdes et une leucopénie (baisse du nombre de leucocytes totaux dans le sang) ont été mises en évidence chez des salmonidés exposés à des concentrations modérées d'atrazine de 0,1 à 1 mg.L⁻¹. Cette baisse du nombre de globules blancs peut accroître le risque d'infection chez les organismes exposés (Walsh et Ribelin, 1975). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Velisek et al., (2008) qui décrivent une baisse du nombre de lymphocytes chez *O. mykiss* exposée brièvement au metribuzine. Une étude récente a montré par ailleurs une action synergique des impacts du glyphosate et d'une contamination parasitaire (Kelly et al., 2010). L'exposition de *C. auratus* pendant 4 semaines à un mélange d'herbicides détectés dans les eaux en Europe (atrazine, simazine, diuron, et isoproturon à une concentration totale de 50 µg.L⁻¹) a permis de mettre en évidence une réduction significative de l'immunité spécifique (dosage d'anticorps) (Fatima et al., 2007). En revanche, d'autres études rapportent une absence d'impact de l'atrazine sur les fonctions immunitaires de carpes, sur la base d'exposition de macrophage *in vitro* et d'exposition *in vivo* par voie orale (Dunier, 1996).

2.3.4 Métabolisme énergétique

De nombreux auteurs ont mis en évidence des dysfonctionnements du métabolisme énergétique chez des poissons exposés aux herbicides (Jyothi et Narayan, 1999 ; Crestani et al., 2007; Moraes et al., 2009; Becker et al., 2009). De

manière générale, les poissons exposés présentent une plus faible teneur en glycogène dans les muscles, un plus fort taux de glucose dans le sang et une élévation du taux de lactate. Cette modification du métabolisme, est souvent interprétée comme un moyen de mobiliser les ressources énergétiques pour lutter face au stress causé par le xénobiotique (Jyothi et Narayan, 1999; Oruc et Uner, 1999 ; Verma et al., 1983). En perturbant les allocations d'énergie chez les individus exposés, ce stress est susceptible d'abaisser le potentiel reproducteur des adultes, la croissance des jeunes et la survie des individus soumis à des efforts intenses. La baisse de la fitness qui en résulte peut avoir des conséquences à l'échelle de la population.

2.3.5 Histopathologie

De plus, il a été démontré qu'une exposition aux herbicides était susceptible d'altérer l'intégrité des cellules, tissus et organes des poissons. Les organes les plus exposés, de part le rôle de surface d'échange avec le milieu (branchies) ou impliqués dans les processus de détoxification (foie) sont les plus souvent affectés.

Des perturbations structurales des tissus du foie (Biagianti-Risbourg et Bastide, 1995) et une induction des mécanismes d'apoptose sur des cultures cellulaires de carpe (*Ctenopharyngodon idellus*) (Liu et al., 2006) ont ainsi été mises en évidence à la suite d'exposition à l'atrazine. L'exposition de deux espèces de poissons élevées en captivité au Vénézuéla (*Caquetaia kraussii* et *Colossoma macropomum*) à une autre triazine, la simazine (72 heures à des doses sublétales), a provoqué des altérations des tubules rénaux (de Bravo et al., 2005). Butchiram et al., (2009) ont mis en évidence de nombreuses altérations histologiques chez des individus de *Chana punctatus* exposés à des concentrations sublétales d'alachlor ($1,21 \text{ mg.L}^{-1}$). Des dégâts sont ainsi détectés sur les branchies (nécroses, dégénérescences vacuolaires, fusion et atrophie des lamelles branchiales), dans le foie (ruptures des vaisseaux sanguins, formations de vacuoles et dégénérescence des hépatocytes) et le rein (gonflements des tubules rénaux, hypertrophies cellulaires et nécroses).

Les cellules sanguines peuvent également être affectées. Des altérations de la morphologie des érythrocytes ont été mises en évidence chez *Clarias batrachus* exposés au 2,4D et au butachlore (Ateeq, 2002). L'exposition au 2,4-D est

caractérisée par un nombre important d'échinocytes (hématies contractées émettant un nombre élevé de spicules) et de vacuoles, alors que l'exposition au butachlore se caractérise par une anisochromasie (coloration inégale) et une anisocytose (variation dans la taille) des érythrocytes. Des observations par microscopie électronique à transmission (TEM) ont par ailleurs montré que ces mêmes molécules pouvaient induire l'apoptose dans les tissus hépatiques et gonades des poissons exposés (Ateeq, 2006). D'autres problèmes histologiques liés à l'exposition au 2,4D ont par ailleurs été mis en évidence, tels que des pertes neuronales, formation d'œdèmes et vacuolisation (Uyanikgil et al., 2009). Le glyphosate peut lui aussi provoquer des altérations histopathologiques dans de nombreux tissus. Des lésions ainsi qu'une induction de l'apoptose ont ainsi été détectées dans les branchies, le foie, l'estomac, l'épiderme et le cerveau de *Piaractus brachypomus* (Ramirez-Duarte et al., 2008 ; Ramirez et al., 2009).

2.3.6 Croissance

Les paramètres de croissance sont également susceptibles d'être affectés par une exposition aux herbicides. Ainsi, un déficit de croissance a été constaté chez des carpes exposées à la trifluraline (Poleksic et Karan, 1999) ou au butachlore (Yadav et al., 2010). Ce type d'impact a également été mis en évidence chez des larves d'ombrine subtropicales exposées à des concentrations sublétales d'atrazine (Alvarez et Fuiman, 2005 ; MacCarthy et Fuiman, 2008). Dans ce cas, les auteurs suggèrent que les larves, plus longtemps vulnérables aux prédateurs peuvent présenter une mortalité accrue. Cependant, il apparaît que les concentrations requises pour induire un impact significatif sur la croissance sont fréquemment supérieures à celles rencontrées dans le milieu. De cette façon, Plhalova et al., (2009) montrent que la croissance est affectée chez *D. rerio* quand la concentration de terbutrine à laquelle ils sont exposés est supérieure à $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, ce qui est une valeur élevée par rapport aux concentrations relevées sur le terrain ($0,02 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans le cadre de l'étude de ces auteurs). Des conclusions similaires sont retenues dans une étude visant à évaluer l'impact de l'exposition au diuron chez *P. promelas*. La concentration nécessaire pour induire une baisse de croissance significative, de l'ordre de plusieurs milligrammes par litre, étant largement supérieure aux doses effectivement rencontrées (Nebeker et Schuytema, 1998). Une étude récente révèle

une réduction du niveau d'hormone de croissance dans le sang des poissons à la suite d'une exposition au glyphosate (El-Shebly et El-kady, 2008). Conjointement avec les modifications d'allocation d'énergie, ce déficit hormonal est susceptible d'altérer la croissance des individus exposés.

2.3.7 Comportement

Le comportement des poissons peut également être modifié, directement ou indirectement, par l'exposition aux herbicides. Une baisse générale d'activité, une perte de l'équilibre, des regroupements, l'accélération de la respiration et des mouvements soudains ont été constatés chez des guppys exposés au 2,4D (Uyanikgil et al., 2009). Une inhibition de l'activité de nage a également été mesurée chez des juveniles de *O.mykiss* exposés à un mélange d'atrazine, linuron et de métolachlore (10, 15, et 45 $\mu\text{g.l}^{-1}$ respectivement) (Shinn, 2010). A l'inverse, une augmentation de l'activité de nage a été mesurée chez des larves d'ombrines tropicales (*Sciaenops ocellatus*) exposées à des concentrations sublétales d'atrazine. En plus de modifier l'allocation d'énergie, cette modification du comportement augmente la probabilité de rencontre avec les prédateurs (Alvarez et Fuiman, 2005).

La modification du comportement peut également être causée par une perception biaisée des substances naturelles. Ce mécanisme est suspecté chez des carassins exposés à une concentration relativement faible (5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) d'atrazine ou de diuron (Saglio et Trijasse., 1998). Il a par ailleurs été démontré que des *Orconectes rusticus* exposés au métolachlore deviennent incapables de localiser leur nourriture et présentent une réponse inappropriée à la détection d'un signal d'alarme (Wolf et Moore, 2002).

2.3.8 Reproduction

En raison de son lien direct avec la fitness, le potentiel de reproduction est crucial d'un point de vue écologique. De nombreuses études ont donc cherché à explorer les éventuelles conséquences d'une exposition aux herbicides sur le pouvoir reproducteur des poissons. Cet impact peut intervenir en amont et/ou en aval de la fécondation.

Ainsi, en plus des effets délétères que les perturbations endocriniennes internes peuvent entraîner sur la maturation sexuelle, les communications par phéromones peuvent également être affectées. En effet, il a été démontré que des saumons atlantiques (*Salmo salar*) mâles exposés à l'atrazine présentaient une réponse affaiblie à la phéromone femelle dont la fonction est de provoquer chez eux le déclenchement de la maturation sexuelle (Moore et Waring, 1998).

Les marqueurs les plus directs pour évaluer le succès de la reproduction sont la production de gamètes, le taux d'éclosion et la survie de larves. Sur la base de ces critères, Bringolf et al. (2004) ont conclu que l'atrazine n'était pas reprotoxique pour le *P. promelas* aux concentrations susceptibles d'être expérimentées dans le milieu. De la même façon, la revue de Solomon et al., (2008) visant à récapituler l'impact de l'atrazine sur les organismes non cibles conclue que l'atrazine en concentration pertinente d'un point de vue écologique, n'affecte pas le potentiel reproducteur des organismes exposés. A l'inverse, une étude récente démontre une altération du potentiel de reproduction, par la réduction du nombre d'œufs produits, chez le *P. promelas* exposé à l'atrazine dans la même gamme de concentrations (Tillitt et al., 2010). Précédemment, d'autres auteurs avaient mis en évidence une baisse de la survie des larves exposées à de fortes concentrations d'atrazine, mais pas d'influence sur le taux d'éclosion ou la croissance (Görge et Nagel, 1990). Des résultats comparables ont été observés après une exposition des larves à un mélange de terbutryn et triasulfuron (Arufe et al., 2004) et diverses altérations du développement ont été mises en évidence chez des embryons de Médaka exposés au thiobencarb (Villalobos et al., 2000)

Par ailleurs, une étude portant sur des cours d'eau du bassin Adour-Garonne a mis en évidence, chez le chevaine, une augmentation de l'indice gonadosomatique (GSI), et une baisse du facteur de condition, en relation avec l'intensité de la contamination par les herbicides (Shinn, 2010). Les auteurs suggèrent que ce résultat révèle une maturation précoce des individus occupants les zones contaminées, via la plasticité phénotypique ou une sélection génétique, qui permettrait d'augmenter le succès reproducteur.

2.4 Populations et communautés

Les mesures effectuées aux échelles supérieures à l'organisme ne sont pas des biomarqueurs *sensu stricto*. Néanmoins, l'ensemble des impacts mesurés depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle individuelle, n'a de sens en terme écologique que si les niveaux d'organisation supérieurs sont affectés. Certaines études ont tenté de mettre en relation la contamination du milieu par les herbicides avec des perturbations à l'échelle des populations ou des communautés. Cette démarche étant difficile à mettre en œuvre pour étudier la faune piscicole, ce type d'étude porte plus généralement sur des organismes plus faciles à manipuler. Ainsi, Hartgers et al. (1998) ont cherché à évaluer l'impact d'un mélange d'herbicides (atrazine, diuron, métolachlore) sur des microcosmes. Ceux-ci étaient dominés par le phytoplancton et incluaient également des daphnies (*Daphnia galeata*) et des copépodes cycloïdes. Si des effets ont été mesurés sur le phytoplancton et sur le fonctionnement de l'écosystème (pH, oxygénation, conductivité), les effets sur la faune au cours de cette étude sont restés faibles. En se basant sur des valeurs de l'IBI (Indice d'Intégrité Biologique), Hall et al. (1999) font état de communautés de poissons en « bon état » dans des cours d'eau exposés à des concentrations modérées d'atrazine (de 0,10 à 98 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et de métolachlore (de 0,10 à 68 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Par ailleurs, la relation entre la présence d'herbicides dans les écosystèmes aquatiques et les impacts sur les populations de poissons peut être indirecte. En effet, le traitement d'un plan d'eau par des herbicides transforme l'habitat, modifiant alors la structure des populations de poissons (Bain et Boltz, 1992 ; Maceina et al., 2008).

2.5 Eléments de choix des biomarqueurs au regard des objectifs de l'étude

L'objectif des biomarqueurs est d'explorer la qualité du milieu au travers de mesures biologiques. De cette façon, le contexte environnemental est intégré dans la réponse qui est mesurée. C'est ce qui représente le principal atout de l'usage des biomarqueurs. Cependant, le filtre biologique, et ces mêmes facteurs peuvent compliquer l'interprétation des résultats. Les paramètres biotiques (sexe, âge, comportement ...) ou abiotiques (saison, hétérogénéité de la contamination ...) complexifient en effet la réponse (Figure 10).

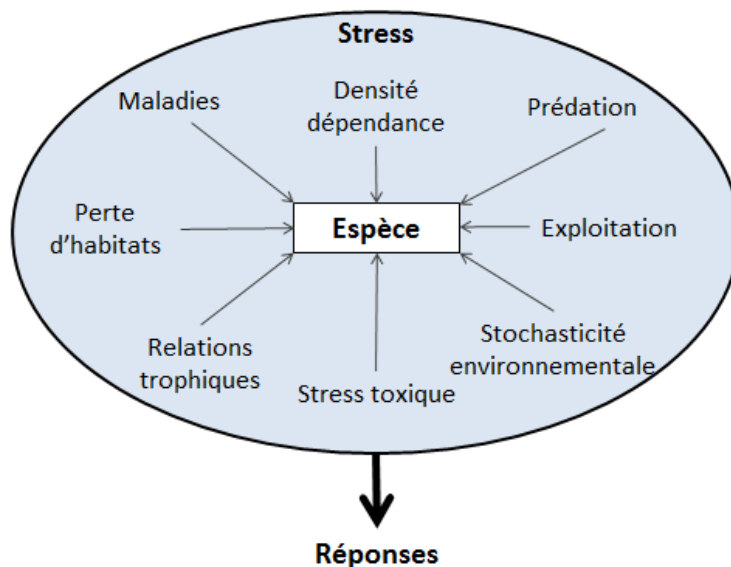


Figure 10 : Illustration de la complexité des relations entre les facteurs de stress et les réponses biologiques (Adapté de Power et Mac Carthy, 1997)

Afin d'utiliser correctement les biomarqueurs, et d'en extraire une information pertinente, il est nécessaire de considérer l'objectif de l'étude. En effet, plusieurs applications doivent être distinguées (den Besten, 1998).

- Dans le cadre d'études de 'screening', les biomarqueurs sont utilisés comme une première approche pour détecter un signal de perturbation. Dans ce type d'approche, on ne cherche pas forcément à interpréter les signaux en terme de pertinence écologique aux échelles biologiques supérieures, en revanche, il est important que le biomarqueur révèle des effets précoces.
- Lorsque les biomarqueurs sont utilisés pour établir un diagnostic de contamination, le signal rendu par les biomarqueurs utilisés doit être spécifique d'un type de contaminants. Il doit permettre de mettre en évidence les conséquences de la présence de tel ou tel contaminant sur les organismes. Cette notion de diagnostic peut s'étendre dans le temps ou l'espace.
- L'utilisation des biomarqueurs peut également intervenir dans un objectif de caractérisation des risques. L'objectif est alors de déterminer si les organismes sont exposés à un niveau de contamination acceptable. Dans ce contexte, le rôle des biomarqueurs est de permettre l'interprétation des mesures abiotiques (analyses chimiques) *via* le filtre biologique, en intégrant les différentes perturbations environnementales et en prenant en compte les facteurs de biodisponibilité. Dans cette optique, les niveaux biologiques sont d'autant plus pertinents qu'ils sont élevés.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons aux effets des épisodes courts de contamination complexe auxquels sont soumis les organismes non-cibles lors des crues dans les bassins versants agricoles. Le choix du type de biomarqueurs utilisé est donc dirigé par l'ensemble du contexte de l'étude.

Tel qu'illustré dans la figure 11, la cinétique de réponse varie selon les biomarqueurs. Certaines modifications biologiques interviennent rapidement à la suite de l'exposition à un contaminant, en amont des effets délétères irréversibles, tandis que d'autres ne sont détectables qu'à la suite d'une exposition aiguë.

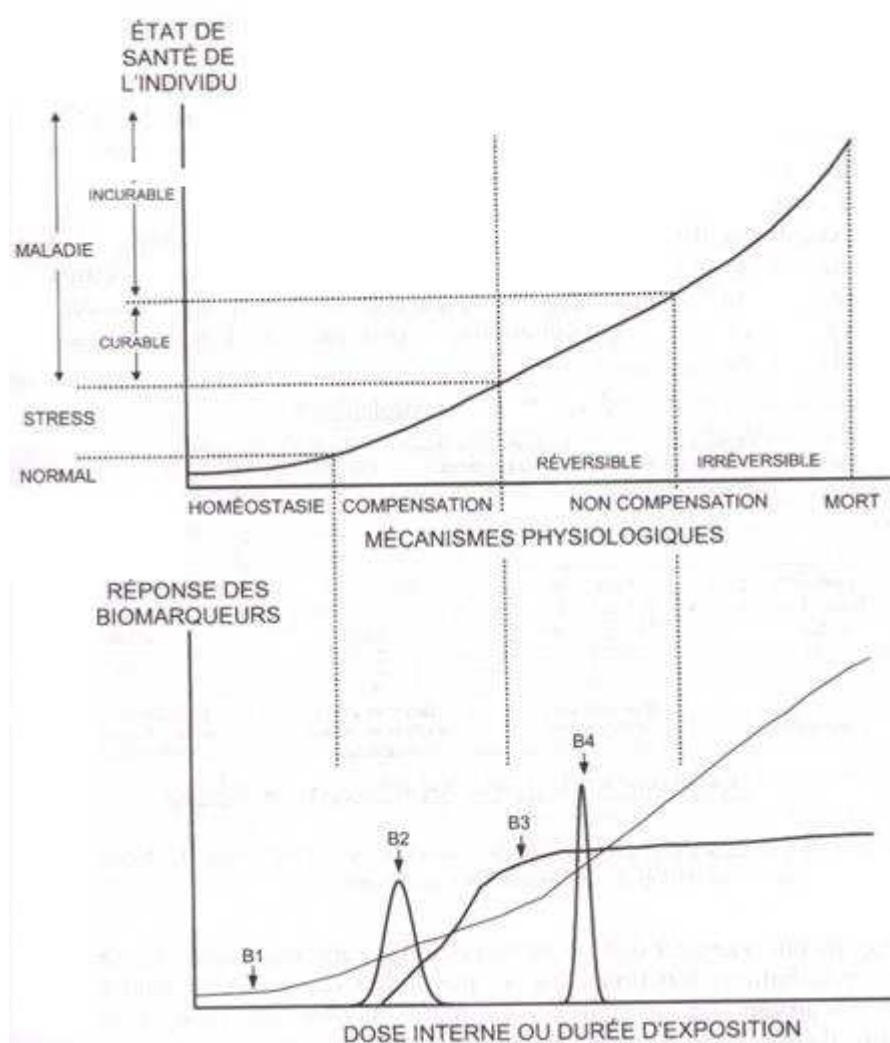


Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge 1994). B1 à B4 : représentations schématiques des réponses de 4 biomarqueurs.

Dans les cours d'eau des bassins agricoles du sud-ouest de la France concernés par les contaminations aux herbicides, les crues sont des événements courts. Celles-ci durent de quelques heures à quelques jours selon la taille du bassin

versant et l'intensité des précipitations. Dans le cadre de cette étude, il est donc nécessaire de disposer de biomarqueurs dont les réponses peuvent être induites sur cette échelle de temps.

Les caractéristiques de cinétique d'un biomarqueur sont par ailleurs souvent associées à son échelle biologique, et donc avec sa pertinence écologique. La figure 12 illustre le compromis nécessaire entre le temps de réponse d'un biomarqueur et son échelle biologique.

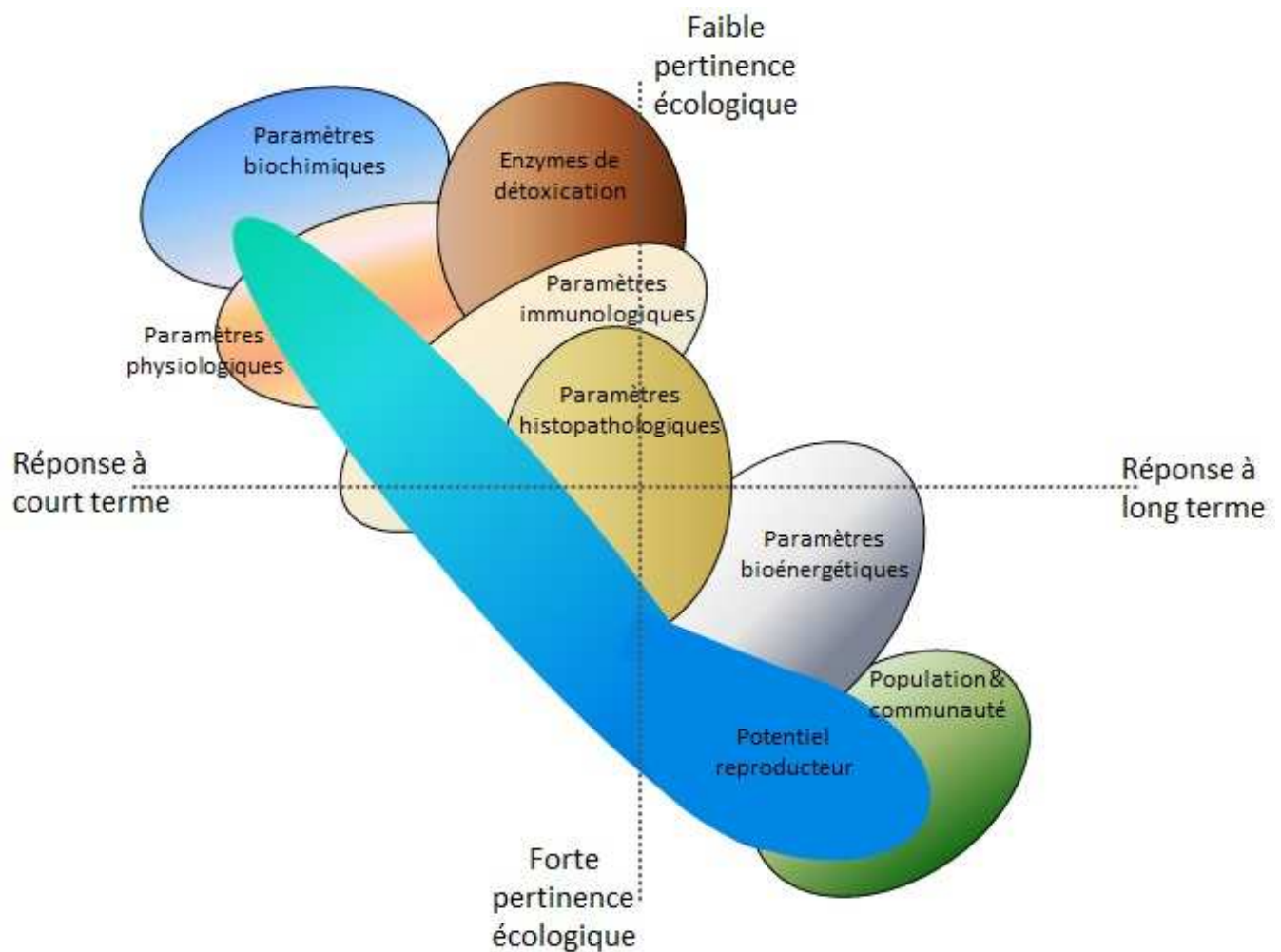


Figure 12 : Représentation schématique des relations entre pertinence écologique et échelle de temps des réponses de biomarqueurs induites par une exposition à un polluant (D'après Adams et al., 1989)

De manière générale, les biomarqueurs les plus précoces sont associés aux échelles biologiques les plus fines et présentent une faible pertinence écologique. Les paramètres biochimiques sont par exemple modulés de façon précoce par les perturbations. C'est le cas des systèmes de détoxification, qui ont pour rôle de juguler la contamination (Chang et al., 2005; Costa et al., 2009). En revanche, ces signaux

ne sont pas nécessairement associés à des effets délétères sur l'organisme, et encore moins sur la population. Or, ce sont bien les échelles biologiques supérieures qui sont pertinentes dans le cas d'études environnementales (en dehors des espèces très rares, pour lesquelles le niveau individuel peut être considéré). A l'opposé, les perturbations mesurées à l'échelle des populations et communautés sont très pertinentes écologiquement, mais elles résultent d'un ensemble de processus biologiques intervenant à plus ou moins long terme et qui ont déjà profondément influencé l'écosystème (Forbes et Calow, 1999).

Si la mesure des capacités de reproduction apparaît comme le paramètre le plus à même de permettre une interprétation précoce et écologiquement pertinente d'un impact, c'est qu'elle intègre un ensemble de réponses biologiques, et ce à différents niveaux. Concrètement, des perturbations génotoxiques, hormonales, métaboliques, histologiques et comportementales peuvent intervenir *in fine* sur le potentiel reproducteur. Cependant, le suivi des paramètres traditionnellement utilisés pour évaluer les capacités de reproduction (nombre d'œufs, taux d'éclosion, survie de larves) sont difficiles à réaliser. Dans le cas de l'utilisation de modèles vertébrés comme les poissons, ce type de mesures nécessite la mise en œuvre de dispositifs particulièrement lourds et coûteux.

D'autre part, la spécificité chimique, permettant de relier le biomarqueur à une famille de contaminants peut être un atout, permettant d'identifier les causes de la perturbation. Cependant, un biomarqueur est d'autant plus pertinent sur le plan écologique qu'il intègre l'ensemble des stress et contaminations (Mitchelmore et Chipman, 1998). Il permet ainsi d'évaluer la globalité de l'impact du milieu de vie. Ce type de biomarqueur, répondant à un large spectre de contaminants est particulièrement adapté lors d'études impliquant des contaminants en mélange complexe. C'est notamment le cas lors des épisodes de crues lorsque le ruissellement entraîne vers le milieu aquatique un grand nombre de molécules différentes. Cependant, plus le biomarqueur présente un spectre de réponse large, plus il est complexe d'associer les effets biologiques mesurés avec une perturbation en particulier (Forbes et al., 2006)

Sur la base des objectifs de cette étude et des limites de l'approche 'biomarqueur', il apparaît qu'un biomarqueur pertinent dans le cadre de ce travail devrait pouvoir être induit rapidement par un large spectre de contaminants, tout en

présentant la plus grande pertinence écologique possible. La molécule d'ADN apparaît comme un bon candidat pour être le support d'un biomarqueur 'transversal'. En effet, sa nature moléculaire rend possible la détection des effets précoces, et son caractère ubiquiste permet de transposer des effets aux échelles biologiques supérieures.

L'impact biologique des contaminations courtes associées aux crues est encore relativement mal connu. Ces contaminations sont complexes en terme de mélanges de molécules et sont associées à un contexte environnemental singulier. Une étude pertinente de l'effet biologique de ces événements devra donc combiner plusieurs approches, en conditions contrôlées, semi-contrôlées et *in situ*. Cette démarche permettra de prendre en considération l'influence du contexte environnemental puis d'identifier la contribution des herbicides sur les effets observés. Par ailleurs, malgré l'extrême variété des effets des herbicides observés chez le poisson, le biomarqueur devra être sélectionné sur la base du contexte de l'étude (une exposition courte à un mélange réaliste d'herbicides) et des contraintes relatives à chacun des biomarqueurs. A ce titre, les biomarqueurs de génotoxicité apparaissent comme de bons candidats.

Chapitre 3 Les biomarqueurs de génotoxicité

1. Les différents biomarqueurs de génotoxicité

De nombreux contaminants sont susceptibles d'interagir, directement ou indirectement, avec le matériel génétique des organismes exposés (Figure 13). Les effets étant mesurés à l'échelle moléculaire, la réponse permet un diagnostic précoce. De plus, les altérations subies par l'ADN peuvent être associées à des effets délétères mesurés aux échelles biologiques supérieures. Ils représentent alors une opportunité d'associer les effets mesurés à l'échelle moléculaire vers les échelles biologiques supérieures, de l'individu jusqu'aux populations.

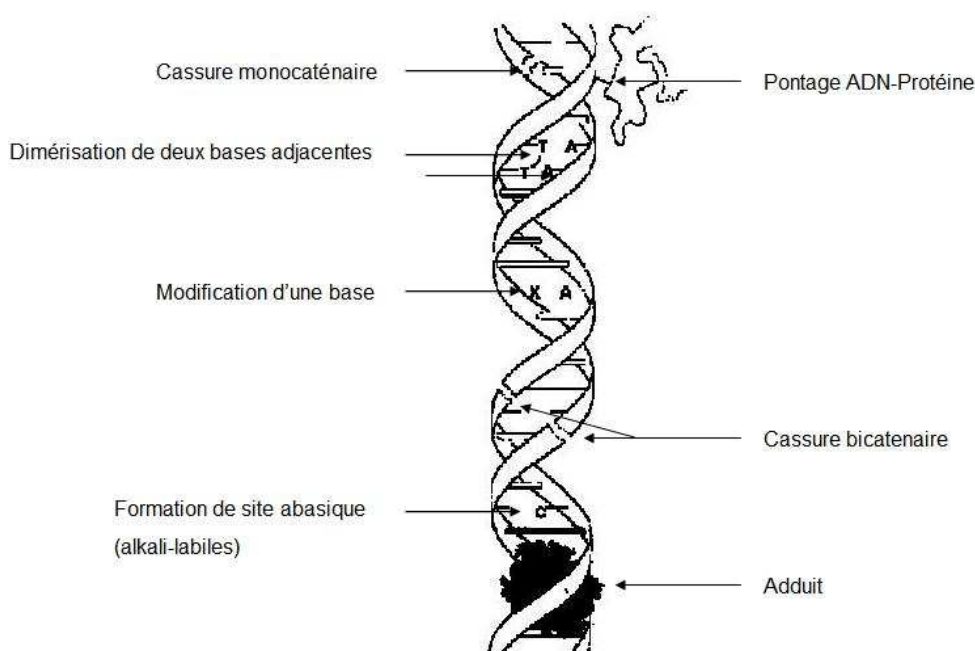


Figure 13 : Exemples de dommages à l'ADN (D'après Devaux, 2006)

Certains contaminants peuvent former des liaisons covalentes, donc stables, avec l'ADN. Ils forment alors des **adduits** (pour « addition » et « produit »). Le plus souvent, ces liaisons ne peuvent se former qu'après l'activation métabolique du contaminant, comme c'est le cas pour les HAP (Eufemia et al., 1997 ; Wirgin et Waldman, 1998). Si les données concernant la formation d'adduits à l'ADN par les HAP sont nombreuses, la formation d'adduits par les herbicides reste en revanche encore largement à explorer. Etant donné les investissements requis et la lourdeur des méthodes à mettre en œuvre dans le cadre de telles techniques, ce biomarqueur ne sera pas retenu pour le reste de l'étude.

La détection de **mutations** géniques peut être utilisée pour révéler un impact génotoxique. Le séquençage de l'ADN est une démarche lourde, qui est rarement envisageable dans le cadre d'études environnementales. En revanche, des tests existent qui mettent en évidence les conséquences fonctionnelles de certaines mutations (drosophila Wing-spot, test d'Ames). Ceux-ci ont déjà été utilisés pour mettre en évidence l'impact génotoxique de l'atrazine (Torres et al., 1992) et de mélanges environnementaux d'herbicides (Whitehead et al., 2004). La détection de mutations dans des séquences ciblées telles que les gènes promoteurs (oncogène ki-ras) ou suppresseurs (p53) de tumeurs a été explorée comme marqueur d'effets mutagènes d'une pollution chimique (Wirgin et Waldman, 1998 ; Cachot et al., 2000). Cependant, la faible occurrence des tumeurs analysées limite l'échantillonnage. Il n'est alors pas toujours possible de conclure sur l'effet d'une pollution.

Parmi les dommages génotoxiques induits chez les poissons par l'exposition aux herbicides, les anomalies chromosomiques et les cassures de brins sont les plus fréquemment observées. Le test des micronoyaux et l'essai comète respectivement permettent de mesurer ces dégâts et de les utiliser en tant que biomarqueurs.

1.1. Mesure des anomalies chromosomiques par le test des micronoyaux

Des anomalies chromosomiques non réparables, dues à des effets aneugènes et clastogènes, peuvent être induites par l'exposition à une contamination. Les échanges de chromatides sœurs (SCE), des aberrations chromosomiques structurales (délétions, duplications, recombinaisons, translocations) et numériques (aneuploïdie, polyploïdie) ainsi que la formation de micronoyaux sont les types de lésions le plus souvent observés. Les essais développés pour quantifier ces impacts et les utiliser en tant que biomarqueurs requièrent l'utilisation de cellules mitotiquement actives et d'assez grands chromosomes (voir la revue de Landolt et Kocan, 1983). Le test micronoyaux est le plus fréquemment utilisé dans le contexte environnemental. Il consiste à quantifier les cellules dans lesquelles un micronoyau est détecté (Heddle et al. 1991).

D'après la définition du test OCDE, les micronoyaux sont des « petites particules qui sont composées de fragments de chromosomes acentriques (sans

centromère) ou de chromosomes intacts qui ne sont pas pris en charge lors de l'anaphase de la division cellulaire. Après la télophase, ces fragments peuvent ne pas être intégrés au noyau des cellules filles et former un ou plusieurs micronoyaux dans le cytoplasme » (OECD, 1997). Ces structures secondaires de chromatine sont enveloppées d'une membrane semblable à celle du noyau et ne présentent aucun lien avec celui-ci (Heddle et al., 1991; MacGregor, 1991; Seelbach et al., 1993; Zoll-Moreux et Ferrier, 1999). La figure 14 illustre la formation d'un MN lors d'une division cellulaire.

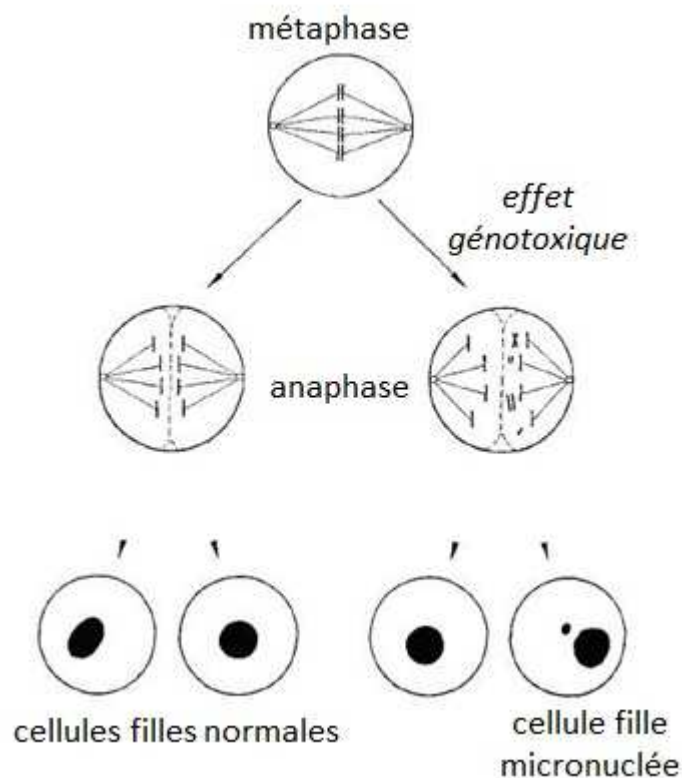


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de formation des micronoyaux dans les cellules (Al-Sabti et Metcalfe, 1995)

Deux types de causes peuvent être responsables d'une telle anomalie. La perturbation des structures non génomiques impliquées dans la division (fuseau mitotique, kinétochore) peut être responsable d'une mauvaise répartition des chromosomes au cours de l'anaphase. L'anomalie chromosomique qui en résulte n'est pas issue d'un impact direct sur l'ADN, on parle alors d'un effet aneugène. Dans d'autre cas, la formation des micronoyaux est le résultat d'un effet clastogène. Une cassure simultanée de deux brins d'ADN conduit à la fragmentation des chromosomes. Les fragments ne possédant pas de centromère ne peuvent pas

être correctement répartis dans les cellules filles. Il est possible de distinguer les micronoyaux issus de l'un ou l'autre de ces effets au moyen de technique d'hybridation in situ (FISH ; pour Fluorescent In Situ Hybridization). En utilisant des sondes spécifiques du centromère on peut mettre en évidence les micronoyaux possédant ou non un centromère. Les micronoyaux résultant d'un effet aneugène répondant positivement à la sonde. Cette technique est utilisée chez l'homme (Migliore et al., 1996) mais très peu chez le poisson.

La formation de MN dans une population de cellules n'est pas strictement associée à l'exposition à un stress, et des MN peuvent se former spontanément. Le taux de base de cellules micronuclées est globalement plus faible chez les poissons que chez les mammifères (Williams et Metcalfe, 1992), mais est très variable, de 0 à 13 d'une espèce à l'autre (Bolognesi et al., 2006). De la même façon, au sein d'une même espèce, des différences de 1 ou 2 ordre de grandeur entre les taux de base ont été reportés, notamment chez la carpe (*C. carpio*) (Landolt and Kocan, 1983; Al-Sabti, 1986; Nepomuceno et al., 1997; Llorente et al., 2001; Gustavino et al., 2001) et la truite arc-en-ciel *O. mykiss* (Schultz et al., 1993; Castano et al., 1998). Le test ne peut donc être interprété que sur la base d'une comparaison entre deux fréquences de détection mesurées au cours de la même étude. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que la fréquence des cellules micronuclées observée résulte d'un équilibre dynamique entre leur formation et leur élimination. En effet, ces cellules peuvent être éliminées préférentiellement par apoptose. Par conséquent, une modification de la fréquence de cellules micronuclées révèle une perturbation de l'un ou l'autre des mécanismes.

Le test MN est largement utilisé sur le modèle 'poisson'. Cependant, dans la mesure où les chromosomes sont de petite taille, les MN le sont également, et il peut être difficile de les détecter. Dans un article publié en 1982, Klingerman préconise l'utilisation des espèces de poissons possédant un génome avec moins de chromosomes, mais de plus grande taille, telles que *Nothobranchius rachowi* ($2n = 16$), *Spharicthys osphoromoides* ($2n = 16$), *Aphyosemion christyi* ($2n = 18$). Ces espèces n'ont été que très marginalement utilisées depuis. Le choix de l'espèce est le plus souvent dicté par le contexte scientifique et écologique de chaque étude. Des différences de sensibilité ont par ailleurs été mises en évidence chez différentes

espèces de poissons, pourtant exposées dans les mêmes conditions. Cette différence est souvent attribuée à des différences d'intensité mitotique ou à des particularités physiologiques pouvant modifier l'accumulation et/ou des différences métaboliques impliquées dans les processus de biotransformation des contaminants (Bardiene et al., 2005).

Ce type d'anomalie peut survenir dans tout type de cellules en division. Le test micronoyau peut donc, en théorie, être mis en œuvre dans la plupart des tissus. En pratique, la fréquence de division, le degré d'exposition des cellules aux contaminants et l'accessibilité des cellules conditionnent le choix des tissus testés. Les cellules branchiales sont parfois utilisées. De par leur fonction de surface d'échange, elles sont particulièrement exposées aux contaminants présents dans le milieu. Associé à un fort indice mitotique, cette caractéristique contribue à la grande sensibilité du test sur ce type de tissus (Manna et Sadhukhan, 1986; Hayashi et al., 1998; Cavas et Ergene-Gozukara, 2003). Cependant, la mise en suspension de cellules requiert des protocoles susceptibles d'endommager les cellules, et le taux de base de cellules micronuclées y est plus important que dans les autres tissus (Cavas et al., 2005). Les cellules hépatiques sont elles davantage exposées aux contaminants pris en charge par les processus de biotransformation, et potentiellement activés par ces mêmes processus. Cependant, l'indice mitotique des cellules du foie est relativement faible. Williams et Metcalfe (1992) ont d'ailleurs proposé d'utiliser de l'allyl formate, un nécrogène hépatique non génotoxique, pour induire une régénération proliférative des hépatocytes pour la durée de l'expérience. Ce protocole n'est cependant pas indispensable, (Vigano et al., 2001; Pietrapiana et al., 2002). De façon comparable, Archimpchuk et al. ont proposé d'utiliser des cellules de nageoire en régénération après avoir été sectionnées pour avoir accès facilement à des cellules à fort indice mitotique et exposées directement au contaminant. L'usage de ces différents types de tissus se justifie au regard de leur indice mitotique et/ou de leur degré d'exposition. Cependant, la préparation des tissus est susceptible de produire des artéfacts pouvant perturber la lecture des lames. Les érythrocytes, nucléés chez le poisson, sont les cellules les plus largement utilisées. Elles sont en effet facilement accessibles car aucune opération n'est nécessaire pour mettre les cellules en solution. Le sang étant composé de 97% d'érythrocytes (Theodorakis et al., 1994), la population cellulaire peut être considérée

comme homogène. Les érythrocytes circulants sont issus de cellules s'étant divisées dans les organes érythropoétiques. Dans le cas des poissons, ces divisions ont lieu majoritairement dans le rein céphalique, mais également dans l'endothélium du cœur et des vaisseaux sanguins et le thymus (Soldatov, 1995). La détection de MN reflète donc une contamination au niveau de ces organes.

1.2. Mesure des cassures de brins de l'ADN par l'essai comète

Un large spectre de xénobiotiques peut affecter l'ADN en induisant des cassures de brins (Eastman et Barry, 1992). De ce fait, la mesure des cassures de brins en tant que biomarqueur permet d'intégrer le potentiel génotoxique global de conditions environnementales complexes. Ceci présente un atout dans un contexte de biomonitoring environnemental (Shugart, 1990 ; Nacci *et al.*, 1996 ; Devaux *et al.*, 1998 ; Mitchelmore et Chipman, 1998). L'élution alcaline et l'essai comète sont les tests les plus utilisés pour mettre en évidence les cassures de brins et les sites alkali-labiles (Shugart et Theodorakis, 1998 ; Shugart, 2000). Ces dommages peuvent être réparables.

Le test des comètes (ou SCGE pour Single Cell Gel Electrophoresis), est l'un des plus largement utilisé dans le cadre des études en génotoxicité environnementales. Il est basé sur la quantification de la migration d'ADN dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique. En effet, les cassures de brins abaissent le niveau de condensation de la chromatine. Celle-ci peut migrer d'autant plus facilement que sa condensation est faible. L'intensité de la migration peut donc être associée à un degré d'altération du matériel génétique.

Ce test est issu des travaux de Cook et Brazell, qui, dans les années 1970, se sont intéressés à l'impact de différents traitements sur la structure de l'ADN libéré des histones et des membranes (Cook et Brazell, 1975). Ceux-ci avaient déjà mis en évidence que l'irradiation de l'ADN induisait une plus grande relaxation, visible par la formation d'un halo à la périphérie du nucléoïde condensé. Une relation effet-dose a même été mise en évidence. En 1984, Östling et Johanson, ont soumis le halo d'ADN relaxé dans un gel d'agarose à un courant électrique. L'application de ce courant a pour conséquence d'orienter la migration, conduisant à la formation de la

figure caractéristique de la comète. L'ADN relaxé migre et forme la queue, alors que l'ADN condensé migre peu et constitue la tête de la comète (Figure 15).

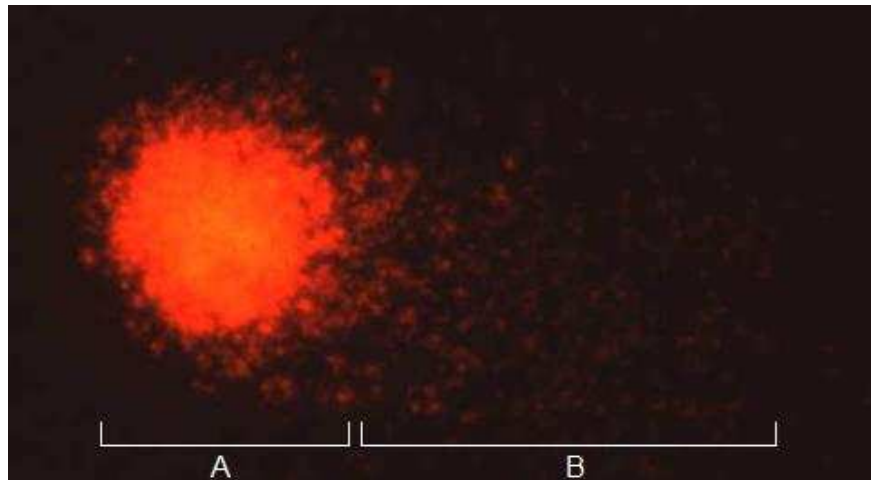


Figure 15 : Comète. A : tête ; B : queue. (érythrocyte de carassin exposé à un génotoxique de référence).

Le test comète met en évidence tout type de dommages conduisant à une relaxation de la structure condensée de l'ADN. Les cassures simples ou doubles brins induites directement par l'action de l'agent génotoxique sont donc mesurées au même titre que les cassures de brins provoquées par les mécanismes de réparation de l'ADN. Depuis les travaux de Singh et al (1988) d'une part et d'Olive et al. (1990) d'autre part, les tests comètes sont par ailleurs le plus souvent menés en conditions alcalines. Les sites alcali-labiles sont alors exprimés sous forme de cassures simples brins. Les avantages de cet outil par rapport aux autres tests de génotoxicité sont nombreux. Le fait qu'il soit relativement simple et peu coûteux, surtout si l'analyse de résultats est visuelle, le rend aisément accessible. Il est également très sensible, permettant la détection de 0,1 cassure pour 10^9 Da (Gedik et al., 1992), et peut être utilisé sur tous types de cellules nucléées. De plus, les dégâts sont mesurés à l'échelle d'une seule cellule, ce qui permet de prendre en compte la variabilité entre cellules d'un même individu. Par ailleurs, le type de dégâts mis en évidence est immédiatement induit, il permet donc la réalisation de diagnostics précoces.

Tout type de cellule nucléée, issue de cultures cellulaires ou prélevée *in vivo*, peut être utilisé dans la mesure où celles-ci peuvent être individualisées en solution. Chez les poissons, les cellules du sang sont nucléées. En plus de permettre un

échantillonnage non invasif, ce type cellulaire présente l'avantage de ne pas nécessiter de traitement préalable pour individualiser les cellules. Dans la mesure où ~97% des cellules sanguines de poissons sont des érythrocytes (Theodorakis et al., 1994), la population cellulaire peut être considérée comme homogène. De plus, l'érythropoïèse se faisant dans des sites spécifiques (rein céphalique), les érythrocytes circulants ne se divisent pas. L'interprétation des dégâts constatés n'est donc pas troublée par le processus de mitose. Ce test peut également être mis en œuvre sur des cellules germinales telles que les ovocytes et spermatozoïdes (Ciereszko et al., 2005 ; Dietrich et al., 2005). Dans la mesure où il a été démontré que le taux de malformations était augmenté chez les embryons issus de spermatozoïdes dont l'ADN est endommagé (Lewis et Galloway, 2009), ces mesures permettent d'appréhender plus directement les conséquences sur la fonction de reproduction, donc la fitness. D'autres tissus, tels que les branchies ou les hépatocytes, sont parfois utilisés, et le test comète peut apparaître plus sensible qu'avec les érythrocytes. Dans le cas des branchies, ceci peut s'expliquer par le contact direct entre les cellules et les contaminants du milieu. Par ailleurs, le foie étant l'organe privilégié de détoxification/décontamination, les hépatocytes peuvent être exposés à des concentrations importantes de contaminants et de leurs métabolites. Cependant, l'utilisation de tels tissus nécessite d'individualiser les cellules. Ceci peut se faire mécaniquement ou par incubation avec des enzymes (collagénase, trypsine, sarcosine), mais est susceptible d'engendrer des cassures de brins (Birmelin et al., 1998).

Le test comète peut être modifié, complété afin d'avoir accès à différents types d'information. Par exemple, en incubant les cellules avec des enzymes, il est possible d'induire des cassures supplémentaires sur des sites reconnus spécifiquement. Ainsi, l'endonucléase III détecte les pyrimidines oxydées alors que la FPG formamidopyrimidine-DNA-glycosylase détecte les 8-oxoguanine et les purines altérées. En comparant les résultats de migration obtenus avec et sans ces enzymes, il est possible de quantifier les dégâts associés à l'action des enzymes et donc aux types d'altérations dont elles sont spécifiques. Le test comète est parfois (rarement) couplé avec la technique FISH (« Fluorescent In Situ Hybridization »). Cette technique fait appel à des sondes d'ADNc ou des oligonucléotides pour hybrider des zones d'intérêt avec un fluorochrome. Il est ainsi possible de localiser les zones dans lesquelles l'ADN est endommagé, et d'identifier les régions du

chromosome qui sont impactées. Ainsi, le signal FISH peut migrer dans la queue de la comète ou être divisé. Le gène p53 est l'exemple le mieux connu (McKenna et al., 2003 ; Kumaravel et Bristow, 2005). Suite à une irradiation il apparaît dans la queue de la comète, alors qu'après un délai de réparation, il apparaît dans la tête condensée. Il est également possible de mesurer le taux de réparation gène-spécifique consécutif à une exposition. Par ailleurs, en comparant la quantité de dégâts mesurés immédiatement à la fin de l'exposition et après un délai permettant la réparation, il est possible de mesurer la vitesse de réparation. A l'inverse, l'incubation des cellules en présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ADN (aphidicoline, cytosine arabinoside par ex) permet de bloquer les mécanismes de réparation. Les dommages non réparés s'accumulent ce qui augmente le seuil de sensibilité du test. Enfin, si de manière générale, le test comète est utilisé pour mesurer des cassures de brins conduisant à une migration de l'ADN dans le champ électrique, les 'crosslink' ADN-ADN et ADN-proteines peuvent également être mis en évidence. Ces dommages se traduisent par une réduction de la migration. En augmentant la durée de migration, il est en effet possible de mettre en évidence une migration plus importante des cellules témoins que celle des cellules présentant ce type de liaisons (Merk et al., 2000 ; Pfuhler et Wolf, 1996).

2. Les avantages

2.1 Une réponse précoce et intégratrice

A l'exception des tests d'Ames et du test « Wing-spot », les mesures de génotoxicité se font à l'échelle moléculaire. L'effet biologique mesuré peut être instantané, comme dans le cas de l'essai comète ou requérir une division cellulaire, comme le test micronoyaux mais dans tous les cas, la réponse est mesurable à des doses sublétales pour les individus. A l'échelle des populations un diagnostic précoce est donc possible. Par ailleurs, dans la mesure où les cassures des brins d'ADN, qu'elles soient doubles ou simple brins, résultent de nombreux processus, directs ou non, ce type de mesure intègre de nombreuses perturbations.

2.2 La pertinence écologique

Si les mesures de génotoxicité sont effectuées à l'échelle moléculaire, certains effets délétères sont susceptibles d'avoir des conséquences aux échelles biologiques supérieures (Anderson et Wild, 1994 ; Anderson et al., 1994 ; Crowe et al., 2004). La figure 16 illustre les leviers par lesquels les impacts génotoxiques peuvent influencer la survie et la fécondité des organismes, c'est-à-dire leur fitness.

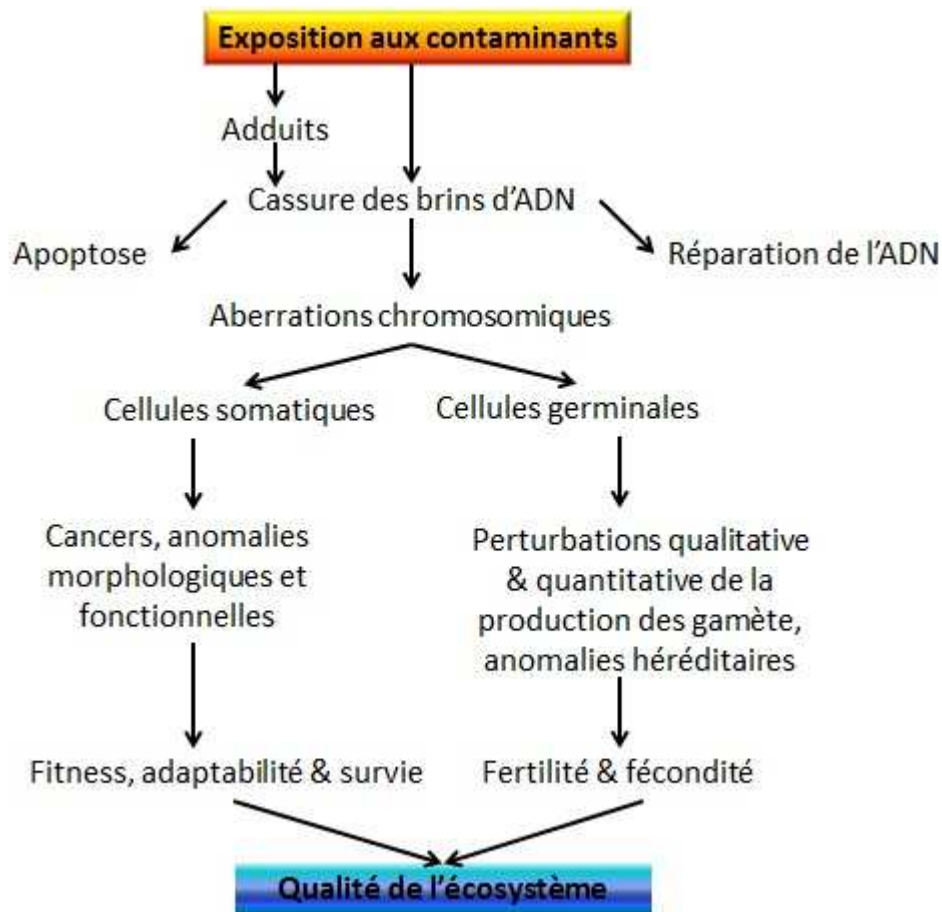


Figure 16 : Impact des dommages génétiques aux échelles biologiques supérieures (D'après Jha, 2008)

Dans le cadre d'études épidémiologiques traditionnelles, chez les mammifères en général et chez l'homme en particulier, les dommages à l'ADN sont souvent mis en relation avec la néoplasie. Cet aspect est abordé par la mesure des adduits, souvent associés à la formation de tumeurs hépatiques (Myers et al., 1998 ; Stein et al., 1990), ou par la détection de mutations sur les gènes directement impliqués dans la cancérogenèse (Wirgin et Waldman, 1998 ; Cachot et al., 2000). Cependant, ce

lien entre génotoxicité et impact n'est pas complètement satisfaisant dans le cadre d'études environnementales.

En effet, la néoplasie est un événement ponctuel affectant majoritairement les individus les plus âgés (Kurelec, 1994). L'influence d'un tel impact individuel sur les niveaux d'organisation biologiques supérieurs n'est donc pas pertinente. Cette passerelle entre les effets génotoxiques et les conséquences écologiques n'est donc pas satisfaisante. Kurelec décrit pour la première fois en 1993 un « syndrome génotoxique global ». Il considère que les effets délétères associés aux altérations de l'ADN doivent être considérés comme un ensemble, et que l'association des différents effets est pertinente écologiquement. Parmi les effets, Kurelec cite la perturbation du fonctionnement des enzymes, du turn-over des protéines, le dysfonctionnement général du métabolisme, la production d'initiateurs de lésions cytotoxiques, l'inhibition de la croissance et l'accélération du vieillissement. A l'inverse de l'induction ponctuelle des cancers, le syndrome génotoxique global intervient de manière dose dépendante, dans chaque organe, après chaque exposition au composé génotoxique. Deplege souligne que ces altérations du métabolisme attribuées à l'impact génotoxique peuvent également être dues à un effet direct du contaminant sur les processus biologiques (1994). Dans un autre article, Depledge (1998) conclut que les effets délétères de la génotoxicité et de la toxicité chimique directe résultent de la somme de plusieurs mécanismes altérant l'intégrité des organismes. D'un point de vue écologique, les impacts sont pertinents s'ils affectent les échelles biologiques supra-individuelles, telles que les populations et communautés. Ce sont donc les effets sur la fitness qu'ils convient d'examiner.

Les altérations des cellules somatiques sont impliquées de façon indirecte dans la reproduction. Le stress induit par un impact génotoxique dans toute cellule de l'organisme (fonctionnement des enzymes, du turn-over des protéines, le dysfonctionnement général du métabolisme, lésions cytotoxiques...) conduit à une modification des allocations énergétiques (De Coen et Janssen, 2003).

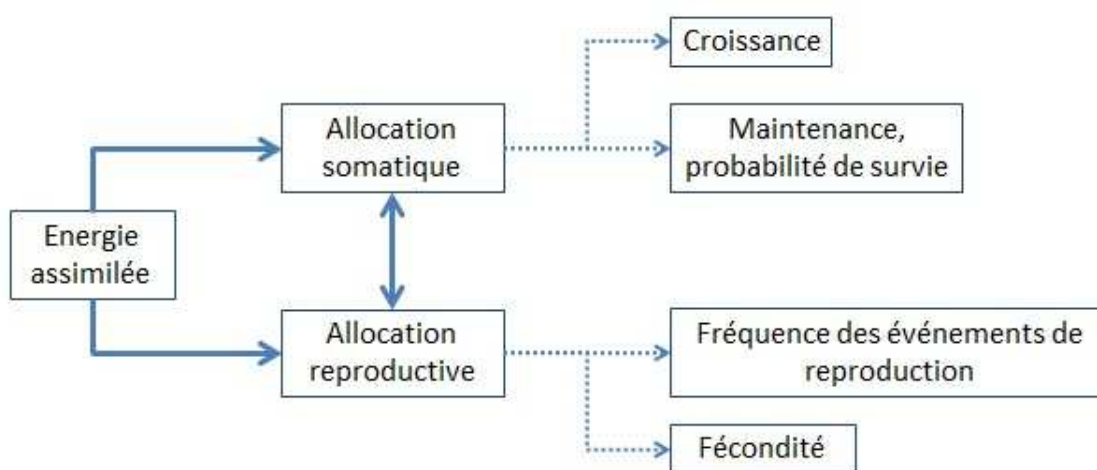


Figure 17 : Modèle général de l'allocation énergétique chez les organismes. (Jha, 2008, adapté de Calow et Sibly)

L'énergie utilisée pour compenser la baisse de probabilité de survie n'est plus disponible pour la reproduction, ce qui induit une baisse indirecte de la fitness (Hawkins et al., 1989) (Figure 17). En plus du nombre de gamètes émis, ce sont la fréquence des événements de reproduction, la qualité des gamètes, les soins post-fécondation qui peuvent être réduits. Une étude a ainsi démontré l'existence d'une corrélation entre les mesures de génotoxicité, la cytotoxicité et des mesures physiologiques et comportementales (Canty et al., 2009). Un déficit de croissance a également été mis en relation avec des dommages génotoxiques chez des bivalves, *Mytilus edulis*, (Steinert et al., 1998) et des carpes indiennes, *Cirrhinus mrigala*, (Yadav et al., 2010). Un tel impact est susceptible de réduire la fréquence des événements de reproduction, et donc la fitness.

Les cellules germinales sont directement impliquées dans la reproduction. Elles conditionnent donc directement la fitness des individus exposés. L'inactivité des systèmes de réparation dans ce type cellulaire les rend par ailleurs particulièrement sensibles (Anderson et Wild, 1994). Les dommages génotoxiques des cellules germinales peuvent compromettre le succès à la fertilisation des œufs. De plus, la suppression rapide des cellules présentant des altérations chromosomiques, ou la réduction de leur viabilité peut conduire à une baisse de la production de gamètes viables (Jha, 2008). Certains auteurs considèrent que la perte des gamètes est compensée quand un grand nombre de gamètes est émis comme c'est le cas pour la plupart des invertébrés et des poissons (Wurgler et Krammers, 1992 ; Dixon et al., 2002). D'autres effets délétères interviennent

cependant. Il a été démontré que l'induction de dommages à l'ADN des cellules germinales pouvait entraîner des mutations dans les cellules somatiques de la génération suivante, susceptibles d'en diminuer la survie. De nombreux travaux ont mis en évidence un lien entre l'intégrité du génome et le taux de survie et le développement chez les poissons (Perry et al., 1988 ; Cameron et Berg, 1992, Lewis et Galloway, 2009).

D'une manière plus générale, de nombreuses études révèlent une corrélation entre génotoxicité et réduction du succès reproducteur, via un impact délétère global sur le nombre de gamètes viables, la croissance des larves et la fréquence des malformations embryo-larvaires (Hose, 1994 ; Anderson et Wild, 1994 ; Théodorakis et al, 1997 ; Lee et al., 2000; Lee et Steinert, 2003).

Par ailleurs, la génotoxicité peut modifier le patrimoine génétique des populations exposées. L'augmentation du taux de mutation dans les cellules germinales, transmises aux générations suivantes, contribue à ce changement (Hauser et al., 2003). Souvent, ces mutations sont délétères. Elles peuvent être directement létales ou bien abaisser la fitness des individus, ce qui entraîne à terme la suppression de la mutation dans la population. Quand ces mutations transmises sont récessives, elles peuvent s'accumuler au fil des générations et constituer un « fardeau génétique ». Ce fardeau peut induire une baisse générale de la fitness de la population (augmentation du nombre de maladies génétiques, baisse globale de la reproduction, des capacités d'adaptation...) (Cajarville et al., 2003). Ces mutations peuvent contribuer à la diversité du patrimoine génétique. De tels exemples sont cependant rares (Ellegren et al., 1997). D'autre part, la pression de sélection exercée par le stress génotoxique favorise certains génomes au dépend d'autres, réduisant ainsi la diversité génétique de la population exposée (Guttman, 1994 ; Belfiore et Anderson, 2001). La modification génétique des populations naturelles par la contamination chimique de l'environnement par des génotoxiques est donc indirecte, faisant intervenir la sélection naturelle (Theodorakis et Shugart, 1998). Cette altération du patrimoine génétique par les contaminants génotoxiques représente un risque à long terme qu'il convient de considérer.

D'autres résultats mettent en relation des dégâts génotoxiques et des impacts mesurés directement aux échelles supérieures. La structure d'âges des populations peut être affectée par l'induction de tumeurs cancéreuses associée à un impact génotoxique (Van Beneden, 1994). Llorente et al. (2001) ont observé une baisse des effectifs et un déclin de la biodiversité dans des milieux où les carpes présentaient une fréquence de micronoyaux importante. La structure d'une communauté peut également être modifiée par des conditions favorisant les espèces tolérantes. Theodorakis et al. (2000) ont ainsi mis en évidence une corrélation significative entre la mutagénicité des sédiments, la quantité de dommages à l'ADN de *Lepomis auritis* et la composition d'une communauté piscicole.

Ces résultats ne permettent pas de conclure à une relation de cause à effet entre les dommages génotoxiques et les impacts sur la fitness des individus ou la structure des populations. Ils renforcent néanmoins l'hypothèse selon laquelle la détection d'altérations au niveau génétique a une pertinence écologique.

Enfin, au delà des considérations environnementales, la connaissance de l'état de la faune face aux menaces génotoxiques présente un intérêt sanitaire. En effet, des corrélations ont été mises en évidence entre des effets génotoxiques mesurés chez les poissons et les populations humaines. Cette corrélation peut s'expliquer par l'exposition à un génotoxique commun pour la faune et l'homme, ou par la consommation de faune (ex poissons) contaminée par des génotoxiques persistants (Black et Baumann, 1991).

Les biomarqueurs de génotoxicité se basent sur la mesure des dommages à l'ADN. Le test comète quantifie les cassures de brin, tandis que le test micronoyaux renseigne sur des anomalies chromosomiques avérées. Tous deux permettent la détection d'effets précoces de la contamination vis-à-vis des organismes, et intègrent les réponses associées à un large spectre de contaminants. De plus, de part le caractère ubiquiste et héréditaire de l'ADN, ces mesures effectuées à l'échelle moléculaire permettent d'appréhender les conséquences aux échelles biologiques supérieures.

Chapitre 4. L'accumulation des molécules dans les tissus biologiques en tant qu'outil pour caractériser la contamination des écosystèmes aquatiques

1.Introduction

Les effets biologiques mesurés sur le poisson renseignent sur la qualité chimique du milieu. De la même façon, le dosage de contaminants dans les tissus de poissons pourrait permettre d'appréhender la qualité chimique des cours d'eau.

Dans le cadre de la contamination des écosystèmes aquatiques par les herbicides, les prélèvements ponctuels d'échantillons d'eau traditionnellement utilisés rendent compte de la situation à un instant donné et ne permettent pas d'intégrer la contamination dans son ensemble. Or, la contamination n'est pas toujours homogène dans le temps. De plus, les méthodes classiques d'analyse chimique ne permettent pas d'évaluer la biodisponibilité des polluants. Afin d'intégrer la contamination dans le temps et la notion de biodisponibilité, de nouveaux systèmes d'échantillonnage sont de plus en plus utilisés. Différents systèmes d'échantillonnage passif ont été développés en fonction du type de contaminant recherché : les DGT (Diffusive Gradient in Thin Films) pour les métaux, les SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) pour les molécules organiques hydrophobes et les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler ; US Patent # 6,478,961) pour les micropolluants organiques à affinités hydrophiles. Ces dispositifs sont immergés dans le milieu à diagnostiquer où ils accumulent les molécules disponibles tout au long de leur durée d'exposition.

Parallèlement à ces méthodes, l'utilisation des organismes naturellement présents dans le milieu en tant que supports analytiques pour la surveillance chimique des écosystèmes aquatiques se développe. En effet, le dosage de contaminants dans les organismes aquatiques révèle, par définition, la contamination effectivement biodisponible et intègre la contamination sur les durées de temps biologiquement pertinentes. La directive NQE (Directive n° 2008/105/CE), directive fille de la directive DCE 2000, définit d'ailleurs des normes de concentrations en contaminants dans les tissus pour 3 des 33 substances prioritaires (l'hexachlorobenzène, l'hexachlorobutadiène et le mercure total).

2. Le biote en tant qu'intégrateur de la contamination

Selon l'objectif de l'étude, différents organismes peuvent être utilisés (Tilghman et al., 2009). La facilité d'échantillonnage des bryophytes en fait un des biomoniteurs les plus utilisés pour le suivi des contaminations en métaux (Bleuel et al., 2005 ; Ah-Peng, 2003). La contamination se fait par adsorption et absorption au niveau des feuilles (Cenci, 2000) et leur sédentarité permet de localiser facilement la source de la pollution. Les bivalves sont utilisés en milieu marin depuis plus de 30 ans. L'usage de la Dreissene (*Dreissena polymorpha*), de la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*) et dans une moindre mesure de l'anodonte du cygne (*Anodonta cygnea*) se développe actuellement dans les eaux continentales (Sousa et al., 2008 ; Wagner et al., 2003). Leur comportement de filtration les exposant à un volume d'eau important, ces organismes sont particulièrement exposés à la contamination. De plus, les adultes sont sédentaires, faciles à manipuler et présentent une longue durée de vie et une bonne résistance à la contamination. En revanche, de nombreux paramètres (taille des particules, température, concentration de la matière en suspension, abondance de nourriture) sont susceptibles d'altérer la filtration et donc de compliquer l'interprétation des résultats. Les premiers stades larvaires de chironomes peuvent quant à eux être utilisés au même titre que les oligochètes pour évaluer l'accumulation des contaminants à l'interface eau/sédiments (Bervoets et al., 2004).

Dans le cas des poissons, le choix de l'espèce conditionne la nature des valeurs mesurées. Les espèces pélagiques telles que le gardon (*Rutilus rutilus*) ou l'ablette (*Alburnus alburnus*) renseignent sur la qualité de la colonne d'eau, alors que les espèces benthiques comme l'anguille (*Anguilla anguilla*), la tanche (*Tinca tinca*), le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) ou la brème (*Abramis brama*) sont également influencées par la qualité du sédiment (Tilghman et al., 2009). Plusieurs paramètres intrinsèques, tels que la teneur en lipides, ont une influence sur les échanges de contaminants entre le milieu et l'organisme. Le sexe, la taille et l'âge sont également susceptibles d'influencer l'accumulation (Van der Oost et al., 1996).

3. Les facteurs conditionnant l'accumulation des herbicides dans les matrices biologiques

La figure 18 récapitule les voies de transfert des contaminants depuis le milieu vers l'organisme, et à l'intérieur de celui-ci. La compréhension des principaux paramètres influençant chacun de ces flux devrait permettre d'interpréter la concentration des contaminants dans l'organisme, ainsi que leur répartition.

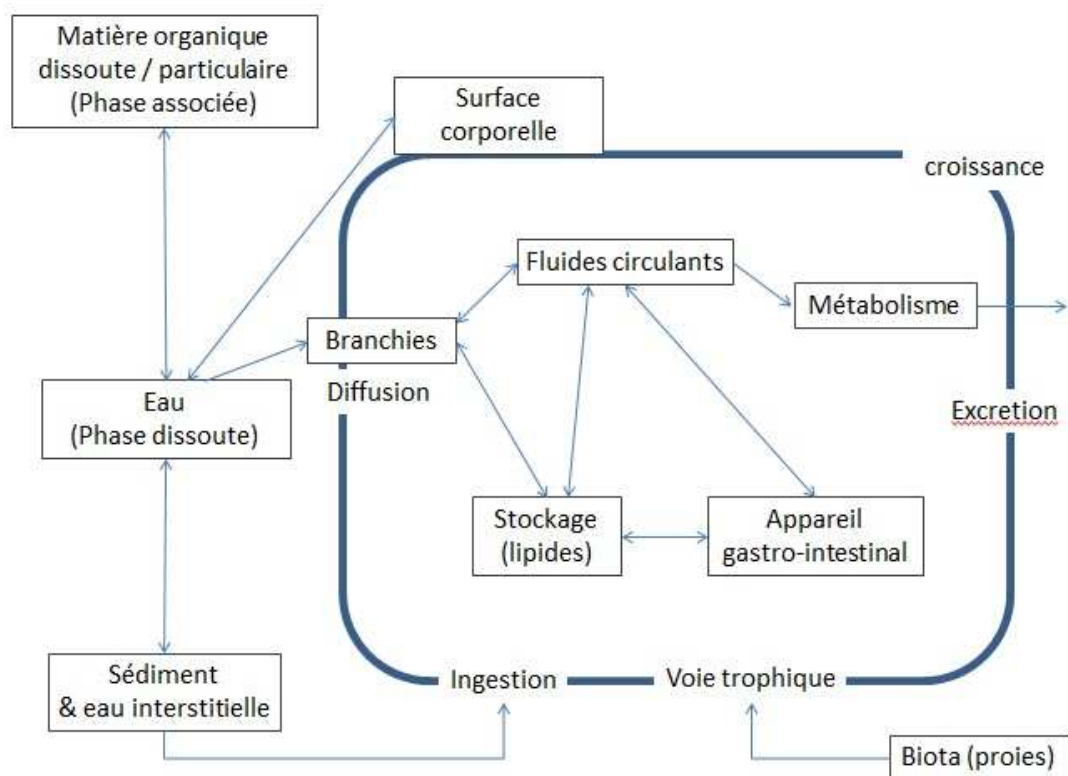


Figure 18 : Diagramme conceptuel des flux et transferts de composés chimiques dans l'écosystème aquatique en relation avec la bioconcentration et la bioaccumulation. (D'après Tagaki, 2010)

Le degré de contamination des organismes résulte de l'équilibre entre l'accumulation des contaminants dans les tissus et leur excrétion ou dégradation. Si les contaminants pénètrent dans l'organisme plus rapidement qu'ils y sont dégradés ou excrétés, les molécules se concentrent dans les tissus. Le « facteur de bioconcentration (BCF) » désigne le rapport de concentration entre l'organisme et le milieu. Il est d'autant plus fort que les molécules pénètrent facilement dans l'organisme et que leur dégradation est lente. Lorsque la contamination est associée à la consommation de proies chargées en contaminants, on parle alors de bioaccumulation. L'augmentation des concentrations en contaminants tout au long du réseau trophique est appelée biomagnification. Ces processus se sont révélés être d'une importance capitale dans le cas des organochlorés.

L'accumulation des pesticides persistants, tels que les organochlorés a été largement étudiée en raison de la préoccupation majeure qu'ils représentent. De nombreuses études décrivent les mécanismes et les facteurs régissant la bioaccumulation de ce type de molécules (Miller et al., 1992 ; Van der Oost et al., 1996 ; Mackay et Fraser, 2000 ; Jacobs et al., 2002 ; Sethajintanin et al., 2004). A l'inverse, il n'existe que peu de données concernant le devenir des triazines, urées substituées et anilides dans les organismes aquatiques. Globalement, les facteurs de bioconcentration mesurés pour les organochlorés sont très dépendants de la solubilité et du coefficient de répartition octanol :eau, le log Kow (Mackay, 1982 ; Davies et Dobbs, 1984). Ce coefficient est une mesure de la solubilité relative d'un composé dans l'eau et l'octanol. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une molécule. Une valeur de log Kow élevée décrit une forte solubilité de la molécule dans l'octanol par rapport à l'eau, révélant son caractère lipophile. Une valeur proche de zéro signifie que la molécule se répartit de manière égale entre les deux phases. Il est généralement considéré que les molécules dont la valeur du Kow est supérieure ou égale à 3 sont suffisamment hydrophobes pour s'accumuler dans les matrices biologiques (Beek et al., 2000). Les herbicides actuellement utilisés présentent une valeur de Kow voisine de 3 (atrazine 2,75 ; métolachlore 3,13 ; Aclonifen 4,37 etc...), sensiblement inférieures aux valeurs de Kow des organochlorés (DDT 6,9 ; PCBs de 4,3 à 8,3 ; Lindane 3,7...). La corrélation entre les facteurs de bioconcentration et le log Kow est illustrée par la figure 19.

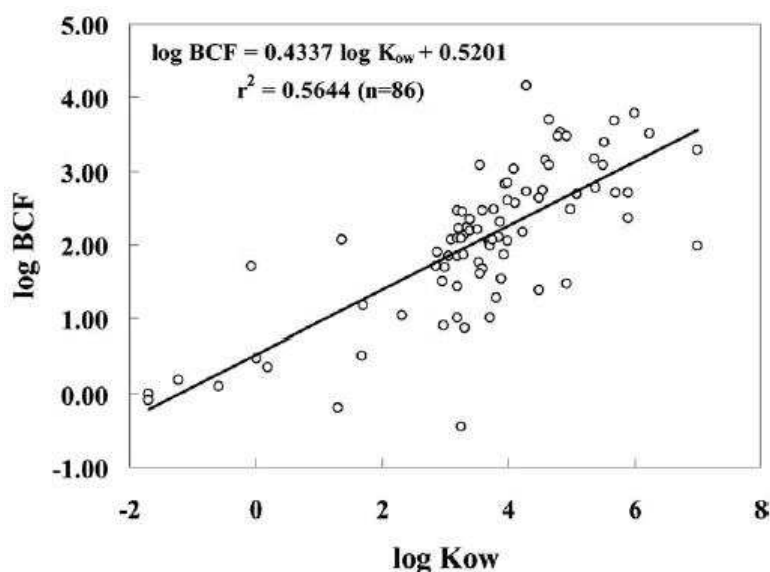


Figure 19 : Corrélation entre le log Kow et le facteur de bioconcentration des herbicides chez le poisson pour les pesticides développés depuis 10 ans (Takagi, 2010)

Cette corrélation repose sur l'hypothèse que les molécules hydrophobes diffusent librement au travers des membranes et enrichissent la fraction lipidique des organismes. Bien que la valeur du log Kow apparaisse comme le principal facteur dirigeant le potentiel d'accumulation, d'autres paramètres peuvent intervenir. Opperhulzen et al. (1985) ont décrit l'influence de la taille des molécules sur leur potentiel de concentration par diffusion au travers des membranes. Selon leurs résultats, une section transversale supérieure à 9,5 Å limite la diffusion à travers les lipides membranaires, et par conséquent le potentiel de bioconcentration. Ces résultats sont confirmés par une étude ultérieure qui a révélé qu'au delà d'une taille de 9 Å les BCF mesurés n'augmentaient plus en relation avec une augmentation du log Kow (Swackhamer et Skoglunds, 1994).

L'impact des processus biologiques influençant le transfert des contaminants tels que les transport actifs ou les mécanismes d'épuration sont encore relativement méconnus. Néanmoins, des modèles sont développés pour prédire la contamination des organismes (Mackay et Fraser, 2000) et des réseaux trophiques à partir de la contamination du milieu. De cette façon, le modèle KABAM, basé sur les travaux de Arnot et Gobas (2004) vise à modéliser la bioaccumulation des contaminants organiques ayant un log Kow > 4 dans les réseaux trophiques des écosystèmes aquatiques.

4. Le dosage des herbicides dans les poissons : l'état de l'art

La bioconcentration des herbicides actuellement sur le marché a majoritairement été étudiée chez le poisson en utilisant des molécules marquées au 14-C. Chez la corégone (*Coregonus fera*) les résultats mettent en évidence une accumulation rapide, mais modérée de l'atrazine dans le foie (Gunkel et Streite, 1980). Les résultats observés chez la carpe sont comparables (Gluth et al., 1985). Les facteurs de bioconcentration alors mesurés sont de 3 à 4 pour le foie, le rein et l'intestin. Ils sont plus faibles (voisin de 1) pour le sang, les muscles et les branchies. Des études menées sur le tilapia (*Tilapia sparrmanii*) confirment ce pattern de répartition de l'atrazine entre les organes (Du Preez et vanVuren, 1992). Ces travaux révèlent une forte variabilité des facteurs de bioconcentration selon les organes, allant de 0,9 à 20,0. Les plus fortes concentrations sont mesurées dans le foie et les

ovaires. Les auteurs suggèrent que cette répartition parmi les organes reflète la relative lipophilie de la molécule ($\log K_{ow} = 2,75$) favorisant l'accumulation dans les organes riches en lipides. L'activité de détoxification du foie, le conduisant à accumuler les contaminants est une autre hypothèse avancée par Du Preez et vanVuren. Cette accumulation préférentielle de l'atrazine dans le foie est également constatée chez des mulets exposés en conditions expérimentales (Biagianti-Risbourg et Bastide, 1995). Cette étude met par ailleurs en lumière la cinétique de la contamination. Ainsi, il a été démontré que la contamination du foie était rapide et que la décontamination pouvait être totale. Ainsi, l'atrazine atteignait sa concentration maximum dans le foie dès 2 jours d'exposition mais n'était plus détectable dans les poissons après 18 jours d'épuration. Chez le poisson-zèbre, le facteur de bioconcentration de l'atrazine est voisin de 10, quel que soit le stade de développement considéré, depuis l'œuf fécondé jusqu'au juvénile (Görge et Nagel, 1990). L'équilibre est atteint dès 5 heures pour les œufs et les larves, et 70 à 85% de l'atrazine est éliminé en 24h. Parallèlement, la métabolisation est relativement faible, seulement 4% en 40h (Gorge et Nagel, 1990). Par ailleurs, le linuron présente un comportement comparable à celui de l'atrazine, avec des facteurs d'accumulation très différents selon les organes. Une étude au ^{14}C sur la perche soleil (*Lepomis macrochirus*) a mis en évidence un facteur de bioaccumulation du linuron allant de 40 dans le muscle et la carcasse jusqu'à 240 dans les viscères. Dans ce cas également l'épuration est rapide et efficace. Après 14 jours d'épuration, 92% du contaminant est éliminé (Du Pont Canada, Inc., 1984.) Certains facteurs environnementaux peuvent influencer la bioconcentration. Ainsi, le facteur de bioaccumulation de la terbutryn est presque multiplié par 5 (de 9,4 à 43,6) quand la température dans l'eau est augmentée de 4°C à 17°C. Une autre triazine, la terbutylazine, ne présente pas de telles variations (6,2 à 8,1) pour les mêmes variations de température (Tarja et al., 2003). Au cours de cette même étude, les auteurs ont mesuré des modifications de l'activité de détoxification en fonction de la nature du contaminant et de la température. Ils suggèrent donc que la bioaccumulation dépend d'un effet synergique entre le contaminant et la température de l'eau sur les mécanismes de détoxification du poisson. On peut constater que les ordres de grandeur des facteurs de concentration confirment les précédentes données. De plus, les auteurs font remarquer que, la terbutryne serait classée comme présentant un risque selon les catégories de l'agence environnementale

américaine (Beek et al., 1992) ($BCF > 30$) à 17°C, mais pas aux températures inférieures testées. Des variations de l'accumulation en fonction de la température chez les poissons avaient déjà été mises en évidence pour un fongicide persistant, l'héxachlorobenzène. Veith et al., (1979) ont reporté des augmentations de BCF d'un facteur de 7 à 10 chez trois espèces de poissons quand la température était augmentée de 5°C à 20°C. Enfin, dans une large revue des coefficients de bioconcentrations (5317 valeurs de facteurs de BCF mesurées pour 842 substances chimiques organiques chez 219 espèces aquatiques), Arnot et Gobas (2006) ont mis en évidence au moins une source d'incertitude pour 45% des BCF. Ces résultats illustrent le fait que la valeur du facteur de bioconcentration seule est peu pertinente. Si elle informe sur le comportement d'un contaminant vis-à-vis de la matrice organique, elle ne reflète pas la complexité des processus impliqués. Ceux-ci varient en fonction de l'organisme et des tissus testés mais aussi des facteurs environnementaux. De plus, cette valeur ne donne que peu d'indications sur le danger représenté par la molécule concernée. C'est pourquoi, alternativement aux études qui s'intéressent au devenir d'une seule molécule chez des organismes exposés en conditions contrôlées, il est pertinent d'évaluer la contamination globale des organismes en conditions environnementales. A l'heure actuelle, il semble donc utile de développer une méthode qui permettrait d'évaluer la contamination des poissons vis-à-vis de l'ensemble des herbicides utilisés (Triazines, Urées substituées, Anilides) auquel ils sont exposés dans le milieu.

La qualité chimique des cours d'eau est traditionnellement évaluée au moyen d'analyses ponctuelles. Cette méthode est mal adaptée pour considérer les événements courts de contamination tels que les crues. Les organismes aquatiques intègrent quant à eux les contaminants biodisponibles, en fonction de la lipophilie et la taille de chaque molécule. La validation d'une méthode de dosage simultané de l'ensemble des herbicides accumulés dans les poissons permettrait donc de caractériser la contamination à laquelle ils ont été exposés.

Synthèse et objectifs de l'étude

Les phytosanitaires sont largement utilisés sur le territoire français. Après leur transfert au sein du milieu, ces molécules contribuent à la contamination des écosystèmes aquatiques. Les réseaux de surveillance nationaux font ainsi état d'une contamination généralisée des eaux de surface. Dans le sud-ouest de la France, où les sols sont majoritairement occupés par les grandes cultures (blé, maïs et tournesol), les herbicides représentent la part majeure de la contamination des eaux par les phytosanitaires.

Une quantité importante de contaminants est exportée lors des épisodes de crues, sous forme dissoute ou associée aux particules du sol entraînées par le ruissellement. Ces événements sont donc associés à des pics de contamination. Actuellement, en raison de leur courte durée, ceux-ci ne sont pas considérés dans le cadre de la surveillance de la qualité chimique des cours d'eau. On ignore cependant l'impact de ce type de contamination sur les organismes aquatiques.

Chez le poisson, des impacts délétères variés ont été mis en évidence lors d'expositions aux herbicides. Cependant, ces résultats ne permettent pas de prédire les effets biologiques des contaminations associées aux crues sur les poissons. En effet, lors des crues, les organismes sont exposés brièvement à un mélange complexe de contaminants dans un contexte environnemental singulier, caractérisé par une forte concentration de matière en suspension. La finalité de ce travail de thèse est d'évaluer l'impact de ce type de contamination sur la faune piscicole. L'ensemble de la démarche expérimentale a donc été développée en considérant l'originalité de ce type de contamination.

Les mesures biologiques considérées devaient permettre la détection d'effets précoces et intégrer les effets d'un spectre large de contaminants.

Les effets biologiques ont été évalués au moyen de biomarqueurs de génotoxicité, les essais comète et micronoyaux (MN). Ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un type de contaminants, et permettent donc l'étude des effets de mélanges complexes. De plus, leur réponse est induite sur une échelle de temps journalière, compatible avec l'étude des épisodes de crues. Par ailleurs, en raison de la nature

ubiquiste de l'ADN, ces biomarqueurs permettent d'appréhender les effets aux échelles biologiques supérieures. Le test MN, dont la validité dans ce contexte expérimental devait être confirmé, a fait l'objet d'une démarche d'optimisation.

La stratégie d'exposition devait permettre d'évaluer les effets de l'exposition aux eaux de crue, mais également d'identifier la contribution des mélanges d'herbicides sur ces effets.

Pour cela, les résultats de trois types d'exposition ont été confrontés. Dans un premier temps, un organisme modèle de laboratoire, le carassin commun (*Carassius carassius*), a été exposé en conditions contrôlées à de l'eau prélevée sur la Save, un site représentatif de la zone d'étude. Trois contextes hydrologiques contrastés ont été testés. La génotoxicité des mélanges réellement présents dans la Save lors d'une crue d'hiver, d'une crue de printemps et d'une situation de débit de base a ainsi été évaluée. Dans un second temps, ce même organisme modèle a été exposé à des mélanges d'herbicides reconstituant i) le mélange observé lors d'une crue de printemps ou ii) le mélange observé lors de l'ensemble des événements de contamination intense sur la Save au cours de la période d'étude. La contribution des herbicides au potentiel génotoxique des mélanges réels a ainsi été estimée. Enfin, des individus d'une espèce naturellement présente sur le site, le barbeau fluviatile, (*Barbus barbus*) ont été exposés par encagement sur le terrain à une crue de printemps. Les conditions environnementales réelles, tant en terme de contamination que d'organismes exposés, ont ainsi été appréhendées.

La contamination des poissons lors de ces événements courts et en présence de matière en suspension devait être caractérisée.

Afin de caractériser la contamination des poissons exposés aux crues, nous avons cherché à quantifier les herbicides présents dans les tissus. En effet, cette mesure permet de considérer l'intégration dans le temps de la contamination et renseigne sur la biodisponibilité des molécules dans le contexte des crues. Aucun protocole d'analyse multi-résidus n'étant décrit pour doser les herbicides (triazines, anilides, urées substituées) dans les matrices organiques dans le cadre d'études environnementales, un protocole d'extraction et d'analyse multi-résidus a dû être développé.

Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1. Contexte expérimental

1. La zone d'étude

La zone d'étude est située sur les coteaux de Gascogne. Ce site a été sélectionné car les phénomènes de flashes de contamination par les herbicides agricoles y sont particulièrement marqués.

1.1 Le réseau hydrographique

Le réseau hydrographique des coteaux de Gascogne fait partie du bassin de la Garonne. Il est constitué de cours d'eau « en arrête de poissons » (Colin, 2000) qui prennent leur source sur le plateau de Lannemezan, s'écoulent vers le nord et rejoignent la Garonne entre Toulouse et Agen (Figure 20). Parmi ces cours d'eau, les principaux sont le Gers, la Save, la Baïse, la Louge et l'Arrats. Ce réseau superficiel représente un enjeu important en terme de ressources en eau. En effet, aucune nappe phréatique conséquente n'est répertoriée dans la région et le besoin en eau, tant pour l'irrigation que pour l'alimentation en eau potable, repose essentiellement sur ces cours d'eau. Les exigences en terme de quantité et qualité sont donc fortes. Depuis le XIX^e siècle, la gestion hydraulique bénéficie du canal de la Neste qui permet de soutenir les étiages d'été. Par ailleurs, l'utilisation de retenues collinaires et l'acheminement de l'eau des lacs de montagne voisins, possible depuis 1950, permettent de faire face au besoin en eau.

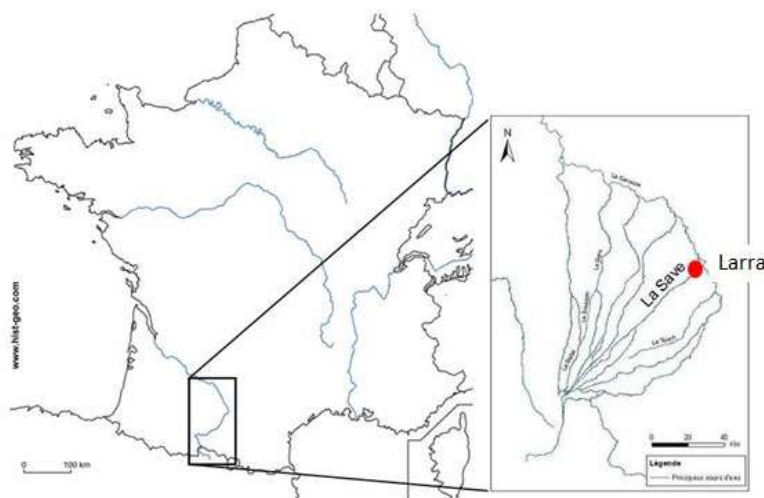


Figure 20 : Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne (Source : <http://www.hist-geo.com> et K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)

Cette région est soumise aux influences climatiques méditerranéennes depuis l'est, océanique depuis l'ouest d'où viennent les vents dominants, et montagnardes depuis le sud. La température moyenne annuelle est 12-13°C, janvier étant le mois le plus froid (moyenne mensuelle entre +5 et +6°C) et juillet le mois le plus chaud (moyenne mensuelle entre +20 et +21°C). Le total de s précipitations annuelles est de l'ordre de 800 litres/m², les zones du sud ouest étant plus arrosées que les celles du nord-est. Cette valeur est proche de la moyenne annuelle nationale (900 litres/m²). Des épisodes orageux, survenant le plus souvent au printemps, contribuent à cette pluviométrie. Ceux-ci suivent généralement une direction SE-NO. Ces événements sont le plus souvent courts (2 à 3 heures) mais peuvent se prolonger jusqu'à 12h. Entre 1984 et 1993, la ville d'Auch a été concernée par une moyenne de 5 orages par mois entre mai et août. (Colin, 2000; Chambre d'Agriculture du Gers, 1996).

Le réseau hydrographique forme un ensemble de vallées dissymétriques. Les rives droites sont composées de sols argilo-calcaire, les « terreforts », issus de l'altération de la molasse (roche sédimentaire détritique). Ils sont caractérisés par une forte abondance d'éléments fins (limon) et une forte proportion d'argile et de calcaire (Enjalbert, 1960). Ces rives sont généralement pentues (3 -15%) et le plus souvent couvertes de forêts et de landes. Les rives gauches sont faiblement pentues et plus intensément cultivées. Le sol limoneux, voire argilo-limoneux, est issu du lessivage des terreforts.

En raison de la faible perméabilité des boubènes, les épisodes d'orages intenses peuvent provoquer des montées rapides du niveau des cours d'eau. Dans ces situations, la gestion hydraulique limite les apports d'eau stockée. Ceux-ci ne diluent donc pas les eaux de lessivage.

1.2 Description du site d'étude, La Save

Parmi les affluents gascons de la Garonne, l'étude porte particulièrement sur la Save. Ce cours d'eau d'environ 145km prend sa source sur le plateau de Lannemezan (64) à une altitude de 600m et se jette dans la Garonne en aval de Grenade (31) (figure 20). La pente moyenne est de 3,6 ‰. Son régime hydrologique est majoritairement pluvial. Les conditions climatiques auxquelles est soumis le

bassin versant sont océaniques, avec des précipitations annuelles de 700-900 mm et une évaporation annuelle de 500-600mm. Le débit de la Save est alimenté principalement par les ruissellements de surface et de sub-surface, il est donc directement dépendant des précipitations. Les fluctuations saisonnières sont par conséquent bien marquées (Figure 21). Les hautes eaux d'hiver et de printemps portent le débit mensuel moyen à des niveaux situés entre 8,02 et 11,80 m³.s⁻¹ de décembre à mai inclus. Les pluies de printemps et d'été peuvent donner lieu à des crues dévastatrices telles que la crue historique de juillet 1977 où le débit a atteint 620 m³/s à Lombez. Lors des basses eaux d'été, de juillet à octobre inclus, le débit descend en moyenne à 1,3 m³.s⁻¹. Si nécessaire pour des besoins d'irrigation, d'alimentation en eau potable et de salubrité, le débit d'étiage peut-être maintenu par le canal de la Neste (2m³.s⁻¹) alimenté en provenance des Pyrénées. Le débit moyen interannuel (module) de la rivière à Larra est de 6,29 m³ s⁻¹.



Figure 21 : Photographies du site de Larra : a) en crue; b) en étiage (Crédit photo : Teisserenc, R.).

1.2.1 Caractéristiques du sol

Le bassin versant de la Save est cultivé depuis le Moyen Age. La distribution du sol est plus influencée par l'érosion mécanique due au travail de la terre (labour) que par l'érosion hydrique. La très faible érosion a conduit à la formation de luvisols calciques (unité de sol UN FAO) sur le substrat tertiaire, et de rendosols locaux sur les lits durs de grès calcaires. Sur les coteaux en pente douce, les cambisols calciques ont été sujets à une érosion modérée. Les 'boulbènes' représentent moins de 10% du sol du bassin versant de la Save. Les sols calciques sont représentés principalement par de l'argile (40-50%) alors que les sols non calciques sont limoneux (50-60%).

1.2.2 Usage du bassin versant

L'activité principale du bassin est l'agriculture. Deux secteurs géographiques peuvent être différenciés. Les coteaux de l'amont sont caractérisés par une couverture forestière et une agriculture traditionnelle à dominante élevage (bovins-viande, porcs et volailles dans le Gers). En aval, le sol est consacré à une polyculture à dominante de « grandes cultures ». Les cultures intensives, maïs, blé, tournesol, représentent une part importante de l'utilisation du bassin versant (Figure 22).



Figure 22 : L'occupation du sol du bassin versant de la Save. En vert, forêts et prairies, en jaune, cultures (Macary et al., 2006).

La densité de population est faible (40.000 habitants) et l'habitat diffus. Environ 60 % de la population réside hors agglomération et seules 8 agglomérations du bassin accueillent plus de 1000 habitants.

1.2.3 La station d'étude de Larra

Le site d'échantillonnage est situé sur la commune de Larra, à 20km au nord ouest de Toulouse. Son emplacement proche de l'exutoire permet de prendre en compte l'intégralité, ou presque, de la surface de bassin versant de la Save. De plus, étant placé en amont de Grenade, ce site présente l'avantage de limiter l'impact de la contamination urbaine de la 2^{ème} plus grande agglomération du bassin (5.700 habitants).

1.3 Suivi hydrologique du cours d'eau

Le suivi hydrologique de la Save est effectué depuis 1965 par la compagnie d'aménagement des Coteaux de Gascogne (CACG). La CACG est une Société Anonyme d'Economie Mixte créée par décret en Conseil d'Etat en 1959. Elle a pour objectif l'aménagement régional, l'équipement et le développement économique de la région Midi-Pyrénées (depuis 1960) ainsi que de la région Aquitaine (depuis 2000). Le débit moyen mensuel de la Save, établi par la CACG sur la base de 46 années de suivi est présenté dans la figure 23.

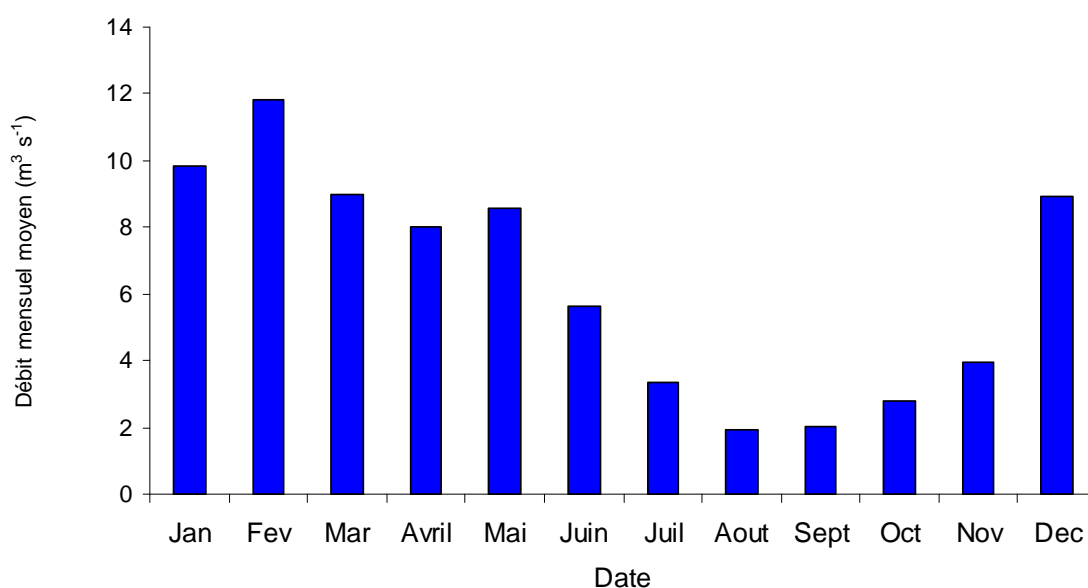


Figure 23 : Débit mensuel moyen de la Save à Larra (Données CACG ; traitement Oeurng, 2010)

Le régime de la Save est pluvial. Il est fortement influencé par les précipitations. Les débits mensuels moyennés ne révèlent donc pas l'hétérogénéité des débits. Dans le cadre de notre étude, une information fine sur les variations de débit était nécessaire. Les données utilisées sont donc issues de sondes multi paramètres installées sur le site depuis avril 2008. Les valeurs de débits moyens journaliers entre avril 2008 et avril 2010 sont présentées dans la figure 24.

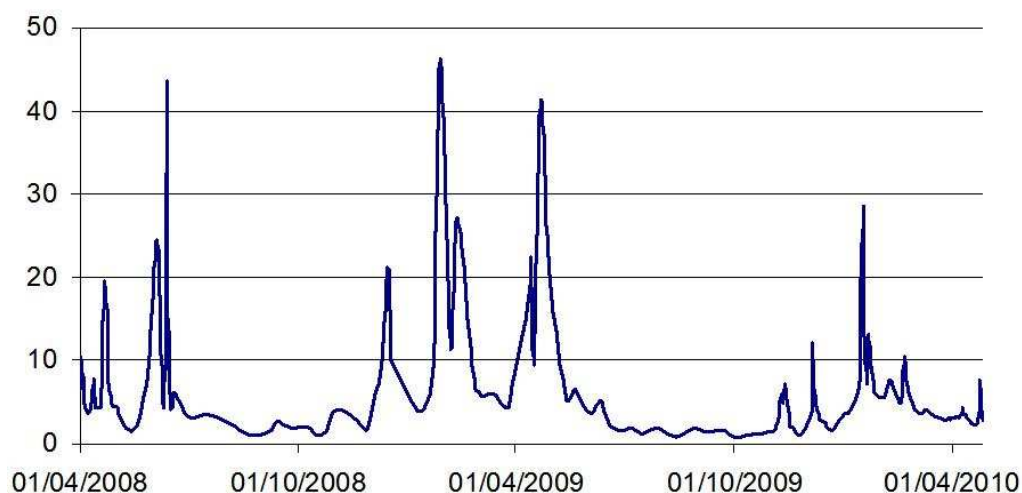


Figure 24 : Hydrogramme de la Save entre avril 2008 et avril 2010.

Cet hydrogramme révèle la forte hétérogénéité des débits. Les débits les plus faibles sont mesurés entre juillet et novembre, ce qui est en accord avec les données moyennes mesurées par la CACG. Au printemps et en hiver, des crues interviennent, de durée et d'intensité variables. Le temps de latence entre le début des précipitations et l'augmentation du débit est variable. Il dépend notamment du degré d'humidité du sol et de l'intensité des pluies. D'après les données disponibles et les observations au cours de la période d'étude, un délai de 6 à 12 heures est généralement observé entre le début de précipitation significative sur le bassin et l'élévation du niveau de la Save à Larra. La durée moyenne des crues est de 4 jours, mais varie évidemment en fonction du contexte météorologique.

2. Le modèle biologique, le carassin commun (*Carassius carassius*)

Le carassin commun (*Carassius carassius*) est un cyprinidé présent dans l'est de l'Europe et l'Asie. Sa morphologie est adaptée aux rivières à faible courant, lacs ou étangs (Figure 25). Omnivore, le carassin commun se nourrit de détritus

organiques, d'algues filamenteuses, de petits animaux benthiques, et de morceaux et graines d'algues aquatiques.



Figure 25 : Le carassin commun (*Carassius carassius*) (Source ; <http://www.fishingcy.com>)

C'est un poisson très robuste supportant des conditions pauvres en oxygène et des variations de température importantes. A ce titre, il est largement élevé en pisciculture. Le producteur principal a toujours été la Chine dont la production a représenté 1,7 millions de tonnes en 2002 (99,6% de la production mondiale). Dans le cadre de notre étude, le carassin commun a été sélectionné en raison de sa disponibilité dans les piscicultures locales.

3. Les tests de génotoxicité

Deux tests de génotoxicité, l'essai comète et le test micronoyaux (MN), ont été utilisés dans le cadre de ce travail. Le protocole utilisé pour l'essai comète en condition alcaline est basé sur la méthode décrite par Tice et al. en 2000, avec quelques modifications. Le test MN a en revanche nécessité une démarche d'optimisation en ce qui concerne le choix de la coloration et de validation dans notre contexte expérimental.

3.1 Le test comète : description du protocole

Les principales étapes de l'essai comète sont représentées dans la figure 26, et sont décrites dans la suite du chapitre. Toutes les étapes ont été effectuées sous un éclairage rouge pour éviter les dommages à l'ADN causés par la lumière.

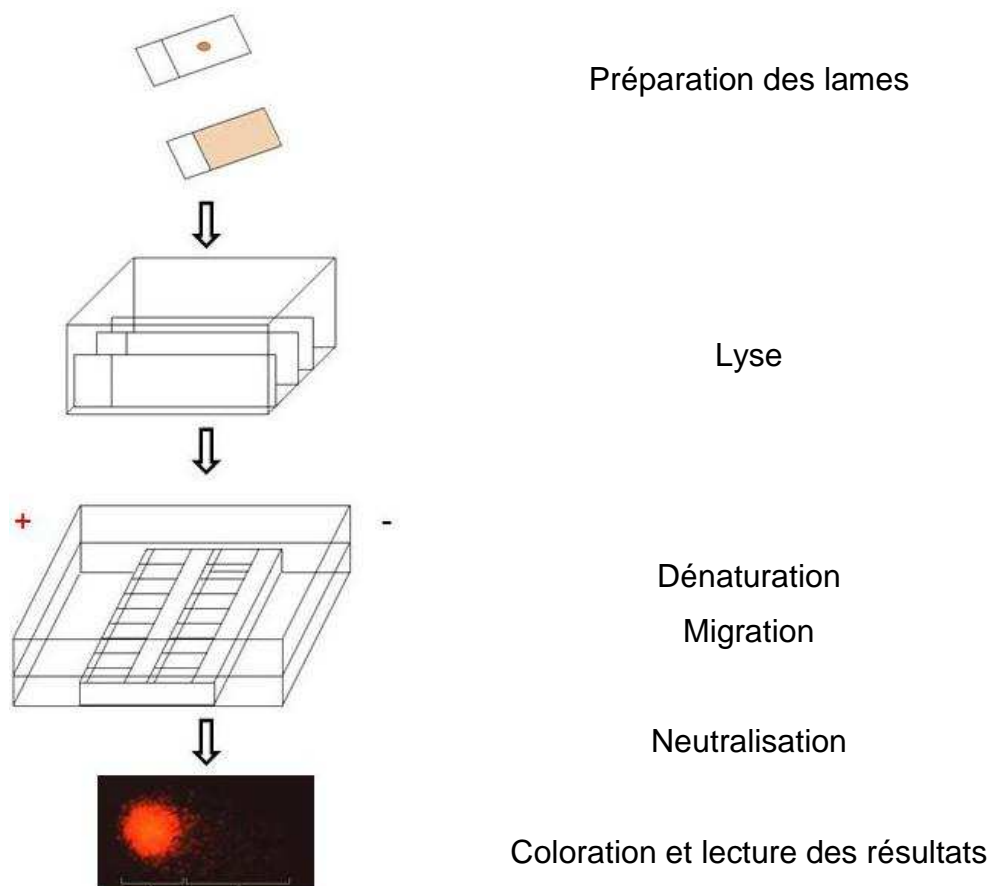


Figure 26 : Protocole schématisé de l'essai comète

Préparation des lames

Dans le cadre de l'essai comète, l'ADN est soumis à la migration directement sur la lame de microscope. Pour cela, le sang prélevé est immédiatement dilué dans de l'agarose à température de fusion basse concentré à 0,5%, puis étalé sur une lame. Afin d'assurer une bonne adhésion du mélange sur la lame, celle-ci est préalablement revêtue d'une sous-couche d'agarose concentré à 1,6%. La concentration de l'agarose et celle des cellules dans l'agarose influent sur le résultat du test. Elles doivent être ajustées pour permettre le déroulement du test dans des conditions satisfaisantes. Plus l'agarose est concentré, plus le réseau sera dense et limitera la migration de l'ADN. Par ailleurs, si la concentration de cellules est trop importante, les comètes peuvent se chevaucher, d'autant plus que les queues des comètes sont longues. Il devient alors impossible d'individualiser les cellules. L'analyse est alors biaisée en contraignant le comptage vers les cellules les moins endommagées.

Lyse

Après avoir figé les cellules dans la couche d'agarose, les lames sont plongées dans une solution de lyse (2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) pendant 90 minutes. Le chlorure de sodium et le détergent non ionique (triton x100) provoquent respectivement la solubilisation des histones et la dispersion des membranes nucléaires. Il est par ailleurs recommandé de maintenir la solution de lyse à basse température afin de ne pas déstabiliser le gel d'agarose. La solution de lyse est donc maintenue au réfrigérateur avant et pendant son utilisation. L'ADN est ainsi mis à nu, et est particulièrement sensible. L'ajout de DMSO dans la solution de lyse permet de neutraliser les radicaux libres issus de l'hémoglobine et qui sont susceptibles d'altérer l'intégrité de l'ADN.

Dénaturation - Migration

L'ADN est ensuite maintenu pendant 20 minutes dans un tampon alcalin (1mM Na₂EDTA, 300mM NaOH). Le pH élevé conduit à la séparation des deux brins.

De l'EDTA est fréquemment ajouté dans la solution afin de prévenir l'activation des endonucléases en chélatant calcium et/ou magnésium.

L'ADN est ensuite soumis à un champ électrique dans le même tampon pendant encore 20 minutes. Le champ électrique oriente le halo d'ADN décondensé vers l'anode. En migrant, celui-ci forme alors une 'comète' par rapport au reste du nucléoïde. L'intensité de la migration dépend du degré de relaxation de l'ADN, donc de l'intégrité de l'ADN. Dans nos conditions expérimentales, la tension du courant était fixée à $8,3 \text{ V.cm}^{-1}$ et l'intensité à 350 mA. Lors de la migration, la cuve était maintenue à 5°C au réfrigérateur afin que les variations de température ne perturbent pas la migration.

Neutralisation

A la suite de la migration, les lames sont rincées au moyen d'un tampon Tris base d'un pH de 7,5. Les brins d'ADN se recombinent, se figeant ainsi dans l'agarose. L'eau est ensuite éliminée par un bref rinçage des lames à l'éthanol. Les lames peuvent alors être stockées pour lecture ultérieure.

Coloration

Les résultats du test se basent sur la quantification de la migration de l'ADN. Celui-ci est visualisé au moyen de fluorochromes. Le bromure d'éthidium (BET) est le plus fréquemment utilisé. Par rapport aux autres colorants utilisés (AO, YOYO dye, SYBR) cet agent intercalant présente l'avantage de peu s'atténuer et permet d'obtenir un bon rapport entre la coloration intense de l'ADN et un fond faiblement coloré. La quantité de fluorochrome fixé est directement proportionnelle à la quantité d'ADN. Ainsi, dans la mesure où la concentration en colorant n'est pas excessive et que le système n'est pas saturé, l'intensité lumineuse à la longueur d'onde d'émission du fluorochrome lié peut être directement associée à une quantité d'ADN. La coloration non fluorescente par nitrate d'argent peut également être utilisée mais présente une plus faible résolution. Dans le cadre de cette étude, l'ADN a été coloré au BET à $2\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Lecture des résultats

L'analyse des résultats du test comète consiste à quantifier la quantité d'ADN ayant migré. L'examen peut se faire visuellement. Les cellules observées sont alors réparties en 5 classes, reflétant des dégâts croissants. Un score est attribué pour chaque condition en sommant les scores individuels de chacune des cellules observées. Cette technique, simple et rapide, présente l'avantage de ne pas nécessiter l'usage d'équipement coûteux. Lors d'études comparatives, les résultats se sont révélés bien corrélés avec ceux obtenus en utilisant des logiciels d'analyse d'image (Kobayashi et al., 1995 ; Collins et al, 1997). Cependant, l'utilisation de logiciels d'imagerie pour analyser les données du test comète est très répandue. Bien qu'il existe différents logiciels, le principe de base est toujours le même: l'intensité lumineuse est évaluée pour chaque pixel de l'image. Après avoir distingué, manuellement ou automatiquement, les zones correspondant à la tête, à la queue de la comète et au fond de l'image, il est possible de déterminer plusieurs paramètres quantifiant la migration. Parmi ces paramètres, quatre sont les plus utilisés

- la longueur de la queue de la comète (Tail length)
- le pourcentage d'ADN présent dans la queue (Tail DNA %)
- le produit de la longueur et de l'intensité de la queue (Tail moment)
- le produit de l'intensité de la queue et de la distance entre les centres de gravité de la tête et de la queue (Olive tail moment)

La mesure de la longueur de la comète n'est informative que lorsque les dommages sont peu importants. En effet, au delà d'une certaine quantité de dégâts ce n'est plus la longueur de la queue qui augmente, mais son intensité lumineuse. De plus, cette mesure nécessite une calibration du système d'analyse d'image, rendant plus délicate la comparaison entre laboratoires. A l'inverse, l'intensité lumineuse relative de la queue par rapport à la tête donnent une indication claire sur l'aspect visuel des comètes. Ce paramètre est le plus souvent utilisé et recommandé (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) ; Burlinson B, Communication au 7th Workshop Comet Assay , Corelaine, UK, 2007). Au cours de cette étude, c'est donc ce paramètre (Tail DNA %), mesuré au moyen du logiciel Komet 5.5 qui a été retenu pour évaluer l'intégrité de l'ADN par l'essai comète.

3.2 Le test MN : validation expérimentale du protocole dans notre contexte d'étude

Afin de mettre en évidence une mutagénicité avérée, non réparable, le potentiel génotoxique des conditions d'exposition a également été exploré au moyen du test des micronoyaux. Brièvement, le principe repose sur le comptage visuel de micronoyaux qui se forment au cours de la division cellulaire. Ceux-ci apparaissent lorsqu'un dysfonctionnement du fuseau mitotique et/ou une cassure du chromosome conduit à une mauvaise répartition des chromosomes dans les noyaux des cellules filles. Ce test est fréquemment utilisé, tant sur des organismes exposés en laboratoire que prélevés *in situ*. En revanche, il a été nécessaire de valider un protocole adapté à notre contexte expérimental d'expositions brèves à un mélange d'herbicides en faible concentration.

Un délai étant requis entre le début de l'exposition à un contaminant et l'induction de MN, il a été nécessaire de déterminer une durée d'exposition satisfaisante dans notre contexte expérimental. Celle-ci devait permettre l'induction de MN tout en étant cohérente avec la durée des pics de contamination observés lors des crues. Pour cela, nous avons testé les durées de 2, 4 et 6 jours d'exposition quant à l'induction de micronoyaux dans les érythrocytes circulants chez *C. carassius* exposés à un agent mutagène de référence, le cyclophosphamide monohydrate (CP).

De plus, en raison de la petite taille des chromosomes, les MN détectés chez les poissons sont relativement petits. Chez les mammifères, il est admis que les micronoyaux ont une taille comprise entre $1/5^{\text{ème}}$ et $1/20^{\text{ème}}$ de la taille du noyau. Chez les poissons, on considère que le rapport de taille entre un micronoyau et le noyau principal est plutôt de l'ordre de $1/10$ à $1/30^{\text{ème}}$ (Al-Sabti et Metcalfe, 1995) et jusqu'à $1/50^{\text{ème}}$ (Bardiene et al., 2005). Deux méthodes de coloration ont donc été testées afin de déterminer laquelle permettait d'assurer une plus grande fiabilité au comptage de ces micronoyaux de diamètre réduit. Des frottis sanguins provenant de mêmes individus exposés au CP ont été colorés au Giemsa ou à l'acridine orange, un fluorochrome, puis leurs scores ont été comparés. Enfin, la validité du test ainsi configuré a été confirmée dans un contexte environnemental sur des poissons exposés à de l'eau de la Save prélevée soit en crue, soit en condition de débit de base.

Comparaison des colorations au Giemsa et à l'acridine orange pour la réalisation du test micronoyaux et validation de son utilisation dans le contexte de la surveillance de la qualité des eaux.

Résumé

Cette étude consiste en une analyse comparative des protocoles de coloration par acridine orange ou par Giemsa dans le cadre du test micronoyaux sur érythrocytes de poissons. L'objectif était d'optimiser ce test dans le contexte de la surveillance de la qualité des eaux. Des poissons (*Carassius carassius*) ont été exposés à un agent génotoxique de référence, le cyclophosphamide monohydrate à 5 mg.l⁻¹ pendant 2, 4 et 6 jours. Pour chaque individu, un comptage des MN a été effectué à partir de lames colorées selon les deux protocoles. Les résultats ont montré une plus grande sensibilité du test lorsque l'acridine orange est utilisée. Dans le cas des lames colorées au Giemsa, la présence d'artefacts ambigus conduisant au comptage de faux positifs augmente la variance aléatoire, ce qui réduit le contraste entre les individus exposés et les témoins. La coloration à l'acridine orange a ensuite été utilisée dans un cadre de surveillance de la qualité des eaux. Des poissons ont été exposés durant 4 jours à de l'eau prélevée dans deux contextes hydrologiques : le débit de base ou une crue de printemps. Les résultats montrent la mutagénicité de l'eau de la crue de printemps.

Mots clés : Géotoxicité ; Test micronoyau ; Acridine orange ; Giemsa ; *Carassius carassius* ; Ruissellement agricole ; Crue de printemps ; Herbicides



Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring

T. Polard^{a,b}, S. Jean^{a,b,*}, G. Merlina^{a,b}, C. Laplanche^{a,b}, E. Pinelli^{a,b}, L. Gauthier^{a,b}

^a Université de Toulouse; INP-ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France

^b UMR 5245 CNRS-INP-UPS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle), 31326 Castanet-Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2009

Received in revised form

29 July 2010

Accepted 1 August 2010

Available online 15 September 2010

Keywords:

Genotoxicity

Micronucleus assay

Acridine orange

Giemsa

Carassius carassius

Agricultural runoff

Spring flood

Herbicides

ABSTRACT

This study concerns a comparative analysis of the acridine orange and Giemsa staining procedures for the fish erythrocyte micronucleus assay. The goal was to optimize the assay in the context of field water monitoring. Fish (*Carassius carassius*) were exposed to a reference genotoxic agent, cyclophosphamide monohydrate 5 mg l⁻¹ for 2, 4, and 6 days before testing. Slides from each individual were scored using the two procedures. The results show that the assay was more sensitive when acridine orange was used. When slides were Giemsa stained, the presence of ambiguous artefacts, leading to false positives and increasing random variance, reduced the contrast between exposed and control samples. Acridine Orange staining was then applied in the context of water quality monitoring. Fish were exposed for 4 days to water sampled in two hydrological contexts: basal flow and spring flood. The results show that exposure to spring flood water in an agricultural stream can induce mutagenicity.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The micronucleus assay (MN) is widely used in fish to investigate the genotoxic effects of chemicals, isolated or in mixtures, present in the aquatic environment (see Al-Sabti and Metcalfe, 1995 and Udrou, 2006 for a review). The method is based on the detection of whole or partial chromosomes not incorporated in the daughter nucleus following mitosis due to clastogenicity (chromosomal breaking) or aneugenicity (mitotic spindle dysfunction). It has been demonstrated to respond to a large number of experimental and environmental carcinogenic pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Pacheco and Santos, 1997), heavy metals (Al-Sabti and Metcalfe, 1995), and pesticides (Grisolia, 2002). Moreover, many studies highlight the impact of the genotoxic burden on Darwinian fitness traits (Kurelec, 1993; Anderson and Wild, 1994; Depledge (1994); Diekmann et al., 2004). This link with a higher biological scale (population level) makes genotoxicity biomarkers highly ecologically relevant. Because fish seem to respond to xenobiotics in the same way as higher vertebrates (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Udrou, 2006)

they are routinely used as sentinel organisms in biological water quality monitoring studies. However, many attempts have been made to increase the sensitivity of the MN assay in fish (Rodriguez-Cea et al., 2003). Two main directions have been explored, aiming either at increasing the MN induction potential or improving MN detection. Several strategies can be used to increase the induction potential of detectable anomalies. Carrasco et al. (1990) who first pointed out the lack of sensitivity of the MN assay in fish, proposed scoring other nuclear alterations (NA) (including blebbed, lobed, vacuolated, and notched nuclei) as complementary biomarkers beside MN scoring. This procedure is now frequently used (Ayllon and Garcia-Vasquez, 2000; Cavas and Ergene-Gozukara, 2003, 2005a,b; da Silva Souza and Fontanetti, 2006; Bolognesi et al., 2006). However, no standardization of nuclear abnormalities exists, and there is no consistent data on the origin of erythrocyte nuclear abnormalities (Strunjak-Perovic et al., 2009). Consequently, here we focus only on MN, widely recognized as an indicator of genotoxic pollution, and for which the scoring process follows well established criteria (Al-Sabti and Metcalfe, 1995). The use of tissues with a high mitotic index, and hence a high potential for MN induction, is also being explored. During the past years, several studies have successfully used embryos, cephalic kidney, liver, gills, and even regenerating fin cells (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Hayashi et al., 1998; Cavas and Ergene-Gozukara, 2005b; Arkhipchuk and Garanko, 2005; Deguchi et al., 2007; Talapatra and Banerjee, 2007). Such procedures

* Corresponding author at: UMR 5245 CNRS-INP-UPS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle), 31326 Castanet-Tolosan, France. Fax: +33 5 62 19 39 01.
E-mail address: severine.jean@ensat.fr (S. Jean).

require complex cell preparation (Bolognesi et al., 2006) and often fish sacrifice. Moreover, the abundance of tissue debris slows down scoring (Frenzilli et al., 2008). The ease of collection and preparation make nucleated erythrocytes the most popular cells for fish MN assay (Udroiu, 2006).

The second way to improve the assay was thus to increase the detectability of the induced MN. The small size of the chromosomes, and thus of the MN, in many species including the widely used cyprinids is frequently pointed out to explain the difficulties encountered in detecting fish MN (Udroiu, 2006). The use of fish with bigger chromosomes, as recommended by Kligerman (1982), is not always possible in the context of ecologically relevant studies. The optimization of the staining procedure could be an interesting alternative to improving MN assay sensitivity. Surprisingly, till date, little attention has been paid to the effects of the different staining procedures currently used (mainly Giemsa and AO) on the sensitivity of the piscine MN erythrocytes assay. In mammals, fluorescent AO staining has been demonstrated to be more reliable and to allow higher sensitivity than the commonly used Giemsa staining (Hayashi et al., 1983; Tinwell and Ashby, 1989; Nersesyan et al., 2006). The AO staining procedure is now routinely used in rodent MN assay (Tiveron et al., 1996; Hamada et al., 2001; Nishikawa et al., 2002; Balachandra Dass and Ali, 2004). In fish, AO staining was first used by Ueda et al. (1992), followed by Hayashi et al. (1998), Bolognesi et al. (2006), and Costa and Costa (2007). In recent years, some authors switched from Giemsa to AO staining (Cavas and Ergene-Gozukara, 2005a). But, as yet, no comparative data are available to recommend Giemsa coloring or AO fluorescent staining in the context of the fish erythrocyte micronucleus assay. Giemsa is still by far the most used staining procedure in fish genotoxicity studies.

The aim of this work was 2-fold. First, we established a comparison between the results from the two most frequently used staining procedures (Giemsa and AO). For that purpose, we exposed a model organism (*Carassius carassius*) to a model genotoxic molecule cyclophosphamide monohydrate (CP) by immersion contact for 2, 4, or 6 days. Second, the selected procedure was validated in the context of water quality monitoring. The genotoxic potential of water from the Save River (France) was investigated during basal flow and spring flood. Because of the surface runoff due to heavy rainfall following herbicide application, the spring flood was expected to be highly contaminated with herbicides (Richards and Baker, 1993; Kuivila and Foe, 1995; Taghavi et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

The Crucian carp, *C. carassius* (Linnaeus, 1758; Cyprinidae) was chosen for its availability. Specimens aged 8–15 months, measuring 9.6 ± 0.8 cm, and weighing 12.6 ± 3 g, were obtained from a local hatchery. The fish were acclimated in filtered dechlorinated water in the rearing facilities two weeks before the experiment. The fish were fed *ad libitum* before exposure and were not fed during exposure. The experiments have been carried out in accordance with the European Ethical Guidelines, with the approval of the National Ethical Committee of the French Scientific Research National Center (CNRS). Fish exposure and handling have been conducted under the supervision of Dr Laury Gauthier, holder of French certificate no.31–103, giving authorization to experiment on living vertebrates.

2.2. Test chemicals and reagents

All the chemicals and reagents used, heparine salt (CAS no. 9041-08-1), cyclophosphamide monohydrate (CAS no. 6055-19-2), benzocaine (CAS no. 94-09-7), acridine orange (CAS no.10127-02-3), methanol and Giemsa solution were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.3. Comparative study

2.3.1. Experimental design

Assays were carried out in six 36 l tanks, each containing 8 randomly picked fish. One tank was used for each exposure time (2, 4, and 6 days) (Cavas, 2008) and another for each parallel negative control. A reference genotoxic compound, cyclophosphamide monohydrate (CP), was dissolved in water at a nominal concentration of 5 mg l^{-1} (Cavas, 2008). The aim of this study was not to measure the genotoxic potential of a given concentration of CP, but to compare the test performance by scoring MN induced by CP after two different staining procedures. As each of the two staining procedures was performed on blood smears obtained from the same fish, the effective concentration of CP in water was not crucial, and no quantitative analyses were performed. Water was artificially oxygenated and renewed daily to minimize changes due to metabolism, complexation, and organisms catabolites.

Fish were anaesthetized with benzocaine 0.12 g l^{-1} (Marques de Miranda Cabral Gontijo et al., 2003). Peripheral blood samples were obtained by cardiac puncture with heparinized syringes and smeared onto slides. After fixing in pure ethanol for 15 min, the slides were allowed to air-dry for 24 h. We prepared 8 slides per fish. Four were stained using Giemsa, and 4 with fluorescent acridine orange. All AO and Giemsa stained slides were coded, randomized, and scored using a blind review by the same observer using an Olympus® BX4 microscope. A mean of 5000 cells were scored by fish. Slides of poor quality due to inefficient puncture were rejected before scoring.

2.3.2. Slide preparation

Giemsa solution was prepared immediately before staining. Solution diluted in demineralized water (12.5%) was centrifuged (10 min; 4000 g) and the supernatant was filtered (Whatman® filter paper, $1.2 \mu\text{m}$). Slides were then immersed in solution for 25 min, rinsed thoroughly with distilled water, and air dried. Cells were scored under $1500\times$ magnification in bright-field microscopy. As recommended by Al-Sabti and Metcalfe (1995), small, non-refractive, circular or ovoid chromatin bodies displaying the same staining and focusing patterns as the main nucleus were considered as micronuclei. An example of a positively identified Giemsa stained micronucleus is shown in Fig. 1a.

The other 4 slides for each individual were stained with a drop of AO (0.003% in Dulbecco PBS) and covered with a glass slip (Ueda et al., 1992 adapted by Cavas, 2008). Because AO stained slides were not able to be stored for a long time, observation immediately followed staining. Micronuclei, exhibiting the same yellow-green fluorescence as the nucleus were scored under epi-fluorescence with a U-MWB2 filter at $1000\times$ magnification (Fig. 2).

2.4. Experimental assessment

2.4.1. Experimental site

The Save River is a Garonne tributary located in the Gascogne area of southwestern France. It is 140 km long and its watershed (1150 km^2) is mainly dedicated to agriculture, with more than 75% of arable land. The main crops are corn, wheat, and sunflower, which require the use of pre-emergent herbicides. There is no major city on the watershed (density: $39.3/\text{km}^2$), suggesting no significant impact of urban pesticide contamination. Sampling was conducted at Larra ($01^{\circ}14'40''\text{E}$ – $43^{\circ}43'40''\text{N}$), just before the confluence of the Save river, consequently offering the maximum effective agricultural watershed.

2.4.2. Experimental design

Assays were carried out in 36 l tanks, each containing 10 randomly picked fish. Each exposure lasted 4 days and had a parallel negative control. Exposure water was renewed every day with water collected in the Save river. Basal flow conditions sampling took place from March 21st to March 24th, 2009. Spring flood sampling was timed to coincide with the first major rainstorm event and took place in from April 12th to April 15th, 2009. Physico-chemical parameters (temperature, pH, conductivity, turbidity) and flow were measured (Table 1). Save water samples were gently heated (water bath, 10 min) to match the rearing water temperature thus avoiding thermal shock for the fish. The micronucleus assay was performed using the AO procedure as previously described.

2.5. Statistical analysis

All results are presented as mean \pm standard error. For the comparative staining study, data were processed using a crossed two-way analysis of variance (ANOVA) for each staining procedure. Factors were treatment and duration of exposure. The dependent variable was micronucleus frequency, weighted by the number of cells scored. The assumption of normality and homoscedasticity of the residuals were tested through Shapiro–Wilk normality and Brown–Forsythe Levene-type test, respectively. The Tukey pairwise comparison test was performed to test differences between each sample and its respective control. The difference between residual variance of both staining procedures was tested with an *F*-test

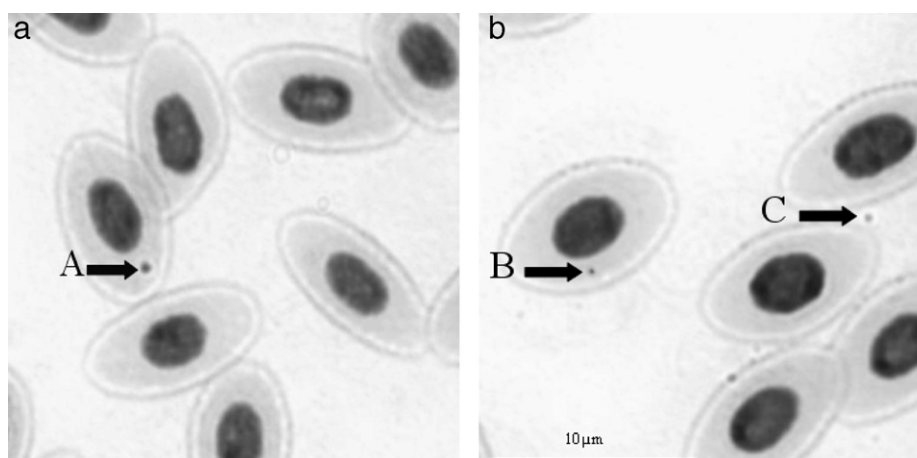


Fig. 1. Giemsa stained peripheral erythrocytes of *C. carassius* ($\times 1500$) after 4 days exposure to CP 5 mg l^{-1} . (A) Micronucleus, (B and C) artefacts.

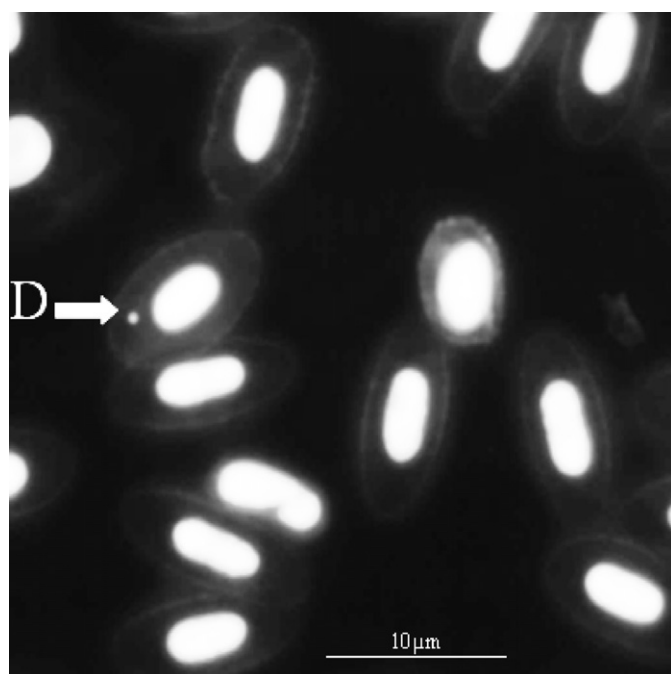


Fig. 2. Acridinde orange stained peripheral erythrocytes of *C. carassius* ($\times 1500$) after 4 days exposure to CP 5 mg l^{-1} . (D) Micronucleus.

for two populations with correlated observations (Kanji, 2006). All statistical analyses were performed using R (Ugarte, 2008). The induction rate was estimated by the ratio of MN frequency between exposed and control samples.

3. Results

3.1. Comparative study

The frequencies of micronuclei and the induction rates observed in peripheral erythrocytes after 2, 4, and 6 days of exposure to CP at a nominal concentration of 5 mg l^{-1} are shown in Table 2. No mortality was observed in any of the 48 fish. The difference between each effective sample size and the initial number of fish exposed in each sample (8) is due to the rejection of individuals in which the blood sampling puncture did not fulfill quality requirement. Whatever the staining procedure the MN induction rates were higher after 4 days.

Table 1
Physico-chemical properties of the test water.

	Basal flow		Spring flood	
	Exposed	Control	Exposed	Control
pH	8.11 ± 0.34	8.01 ± 0.05	7.97 ± 0.05	8.1 ± 0.14
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	16.5 ± 0.2	16.7 ± 0.17	17.3 ± 0.3	17.5 ± 0.45
Conductivity ($\mu\text{S/cm}$)	583.3 ± 9.6	558 ± 2.9	571.2 ± 8.6	564 ± 10.4
Oxygenation rate	$98 \pm 5\%$	$94 \pm 2\%$	$85.6 \pm 10\%$	$89.5 \pm 3\%$

Values are the average value of daily measurements for the 4 days of experiment \pm standard error.

Results of the crossed two-way analysis of variance (ANOVA) for each staining procedure are shown in Table 3. Considering all the durations of exposure together, the exposure to CP at a nominal concentration of 5 mg l^{-1} led to micronucleus induction in a significant way, for both AO and Giemsa staining ($p < 0.001$ and $p = 0.01$, respectively). There was no time-dependent change in micronucleus induction between 2, 4, or 6 days of exposure for AO ($p > 0.05$). Time had a significant impact on MN frequencies when Giemsa was used ($p < 0.05$). Tukey tests revealed no difference between 2 and 4 days ($p > 0.05$), but a higher MN frequency after 6 days ($p < 0.05$) in Giemsa stained slides. Although not significantly different from other control MN frequencies ($p > 0.05$), the higher MN frequency for the negative control at 6 days could explain this result. Moreover, the intra-sample variance was lower with AO than with Giemsa, 0.27 and 1.195, respectively. The *F*-test with correlated observations showed that residual variance with Giemsa was greater than with AO (Table 3).

When each experimental sample was compared with its respective control sample for each duration of exposure, MN induction was not significant at any time in Giemsa stained slides (Tukey, $p > 0.05$). In contrast, micronucleus frequency was always significantly higher in exposed fish on AO staining (Tukey, $p < 0.05$) (Table 2).

3.2. Experimental assessment

The frequencies of MN after 4 days of exposure to water sampled in the Save River are shown in Table 4. There was no significant difference in MN frequency between fish exposed to water taken during basal flow and to control water. MN frequency in fish exposed to water taken during the flood was significantly higher than in the controls.

Table 2Frequency (%) of micronuclei scored in control fish and in fish exposed to 5 mg l⁻¹ CP and MN induction rate.

Exposure (days)		Giemsa (n)	Induction rate	Acridine orange (n)	Induction rate
2	Control	2.41 ± 0.76 (8)	1.24	0.66 ± 0.36 (8)	2.40
	Exposed	2.97 ± 1.28 (8)		1.58 ± 0.79 (8)*	
4	Control	2.04 ± 1.05 (7)	1.70	0.59 ± 0.32 (7)	2.67
	Exposed	3.46 ± 1.35 (7)		1.59 ± 0.57 (7)*	
6	Control	3.41 ± 1.03 (7)	1.16	0.68 ± 0.43 (7)	2.32
	Exposed	3.96 ± 0.91 (7)		1.57 ± 0.47 (6)*	

Data are shown as the mean frequency of MN for each treatment group (%), ± standard deviation, (n=number of fish).

* Denotes a significant difference from the corresponding control group at the $p < 0.05$ level (Tukey).**Table 3**

Analysis of variance of MN frequency as a function of treatment and time.

	Acridine orange		Giemsa	
	Mean square	p	Mean square	p
Treatment	9.41	10 ⁻⁶ *	8.56	0.01*
Time	0.0043	0.98	3.86	0.013*
Treatment × time	0.0091	0.97	0.83	0.73
Residuals	0.27		1.195	

Mean square refers to the estimate of the variance based on the variability among the set of measures.

* Denotes a significant effect of the factor at the $p < 0.05$ level.**Table 4**

Frequency of micronuclei scored in control fish and fish exposed to basal flow water or spring flood water for 96 h.

	Basal flow (n)	Spring flood (n)
Control	0.40 ± 0.2 (10)	0.44 ± 0.15 (8)
Exposed	0.54 ± 0.5 (9)	1.275 ± 0.46 (9)*

Data are shown as the mean total frequency for each treatment group, ± standard deviation (n=number of fish).

* Denotes a significant difference from the corresponding control group at the $p < 0.05$ level (Tukey).

4. Discussion

4.1. Comparative study

The MN frequencies observed in the present study are in agreement with the literature. The baseline MN frequencies measured are consistent with the results observed in *C. auratus* by Cavas (2008) and Cavas and Konen (2007) and in the range of variability of 1–2 orders of magnitude reported by Bolognesi et al. (2006). The rate of induction by the CP solution at nominal concentration of 5 mg l⁻¹ is low compared to previous studies (Cavas and Konen, 2007; Cavas, 2008). As MN induction requires cell division, this difference can be explained by a lower mitotic rate caused by a lower average temperature and by the use of older fish.

The MN frequency was always higher measured with Giemsa than with OA in both exposed and control samples. Because of the high contrast between green AO stained DNA and the dark background, we assume that no MN were missed during the scoring (Tinwell and Ashby, 1989). In accordance with the literature, even with the highest care in solution preparation, Giemsa does not stain solely actual MN, but also stains ambiguous

artefacts such as cell debris or protein granules (Nersesyan et al., 2006; Winter et al., 2007; Costa and Costa, 2007). The identification of authentic MN among all the artefacts is then time consuming because the focusing pattern is often the only reliable distinctive criterion. Fig. 1b exhibits examples of staining artefacts. 'C' indicates a confirmed artefact, because of its location outside the cells. On the other hand, 'B' is susceptible to be mistaken for a micronucleus, leading to a false-positive detection. Only a detailed analysis of its slightly different focusing pattern, compared with the main nucleus, allows a conclusion to be reached concerning the real status of the material observed. Therefore, the higher MN score in Giemsa slides should be attributed to artefacts mistaken for MN even with time-consuming checking and rejection of doubtful items (Heddle and Salamone, 1981). Such an overestimation of MN frequency has already been pointed out for Giemsa stained slides, in the case of human exfoliated oral mucosa cells (Nersesyan et al., 2006). Nersesyan et al. demonstrated that the keratin bodies that form in mucosal cells resemble micronuclei with non-specific staining, leading to false positives. In fish erythrocytes, such keratinization cannot be considered, and artefacts are most likely to be coloration grains or protein granules (Costa and Costa, 2007), which are not expected to be more represented in either exposed or control samples. AO is a nucleic-acid-selective fluorescent cationic dye, which emits green light (525 nm) when excited (502 nm) only if bound to DNA. Thus, no ambiguous artefacts may confuse the observer in AO stained slides (Fig. 2). As a result, the scoring process is faster and more reliable (Hayashi et al., 1983).

False-positive artefact scoring in Giemsa-stained slides is responsible for background noise. This is illustrated by the random variance in ANOVA, higher with Giemsa than with AO. Given the low MN induction rate, this background noise significantly reduces the contrast between control and exposed samples. The resulting loss of detection power is stressed in the present study. When considering all three exposure times together (44 individuals), the Giemsa staining detected a statistical difference between exposed and control individuals, whereas when samples of different exposure times are considered separately in the post-hoc Tukey test (16 individuals), the difference appears to be non-significant. Considering the time required for scoring with Giemsa staining, improving the statistical power by increasing the number of individuals is not desirable.

The usual drawbacks of fluorescent staining cannot be considered in the context of MN scoring. No fading was observed while scoring during this study and the one-by-one staining strategy allow quick scoring of stained slides. Using AO, MN can be scored selectively in immature erythrocytes (Ueda et al., 1992; Cavas and Ergene-Gozukara, 2005a; Cavas, 2008). AO maximum excitation shifts to 460 nm when bound with RNA and the maximum emission shifts to the red (650 nm). A red-stained cytoplasm is then characteristic of an immature RNA-containing

cell. However, immature erythrocyte frequency depends on the erythropoiesis intensity and is low if the organism exhibits little mitosis. In our experimental conditions, immature erythrocyte frequency was too low to restrict MN scoring to this type of cell. Nevertheless the assay was sensitive enough to allow discrimination between exposed and control samples when AO was used.

The time course study supports previous studies dealing with MN assay in *Carassius* sp. (Cavas, 2008). More widely, MN are generally induced in fish after 1–6 days of exposure (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Grisolia and Cordeiro, 2000; Udroui, 2006). In this study, the highest induction rates were measured after 4 days of exposure whatever the staining procedure. Statistical analyses revealed a higher MN frequency after 6 days of contact when slides were stained with Giemsa. In this case, MN frequencies were high in both control and exposed samples, resulting in a low induction rate. No difference in MN frequencies was detected between each duration of exposure for AO stained slides. Stability in control MN frequencies from one exposure time to another confirms the high reproducibility of the results in our negative control conditions. A longer exposure time could have been performed in order to determine the MN induction kinetics in our experimental conditions. Given that no significant time variation occurred in AO stained slides, the three times of exposure can be used in experimental assessments without distinction. Analysis of the flow data from the Save River (1994–2008) revealed that the average duration of a flood was 4 days. Given that this duration coincides well with high induction rates, the exposure time of 4 days was retained for stream water monitoring.

4.2. Experimental assessment

MN assay was used for field water quality monitoring (Lemos et al., 2007). In order to validate the AO staining procedure in this context, we investigated the mutagenicity of water collected in two hydrological conditions typical of an agricultural stream contamination pattern. Short contamination events are rarely considered in water quality monitoring programs. However, this type of contamination occurs during floods in agricultural streams. It has been demonstrated that the highest contaminant loads in agricultural streams are measured when rainfall causes surface water runoff, providing a major transport mechanism for pesticides. This phenomenon is emphasized in spring when the rainfall happens shortly after pesticide application (Richards and Baker, 1993; Kuivila and Foe, 1995; Schulz, 2001; Ferenczi et al., 2002). Fenelon and Moore (1998) describe an increase in atrazine level from trace level to $14 \mu\text{g l}^{-1}$ during spring floods in a small Indiana watershed where corn and soybean are the main crops. In the Gascogne area, where the Save River is located, the major contaminants are pre-emergent herbicides used for crops of corn, wheat, and sunflower (Devault et al., 2009). These herbicides, belonging to the families of triazines (atrazine, DEA, cyanazine), ureas (isoproturon, linuron, chlorotoluron) and anilides (metolachlor, metazachlor), are mostly applied in spring. High contamination of water during spring flood has been reported (Debenest et al., 2008). Taghavi et al. (2010) reported a 10-fold increase in chlorotoluron and linuron concentration in the Montoussé creek, a tributary of the Save river, during a flood in May 2008. Aquatic organisms are then exposed to a pulse of a mixture of herbicides. Genotoxicity of metolachlor and atrazine in aquatic organisms has already been discussed (Clements et al., 1997; de Campos Ventura et al., 2008), but little is known about the impact of pulse contaminations during floods. Few authors have pointed out DNA damage induction (single, double strand breakage or alkali-labile sites) by agricultural runoff (Whitehead et al., 2004; Bony et al., 2008). Mutagenicity has been demonstrated by Ames bacterial

mutagenicity assay (Whitehead et al., 2004), but until now, MN induction had not been investigated in this context. In this study, MN induction was detected in fish exposed to Save River water sampled during the spring flood, but not in fish exposed to water sampled during basal flow. The pulse of agricultural contamination associated with the flood, as described in the literature (Richards and Baker, 1993; Kuivila and Foe, 1995; Fenelon and Moore, 1998; Schulz, 2001; Ferenczi et al., 2002; Debenest et al., 2008; Taghavi et al., 2010), appears to be mutagenic in the context of our study. This is the first time that an agricultural flood is demonstrated to induce MN in fish, revealing the mutagenic potential of short contamination events. At this point, the detected genotoxicity cannot be attributed to a contaminant in particular. Further studies are required in order to explore the chemicals, or mixture of chemicals, which exhibits the higher genotoxic potential in the Save river. This result constitutes evidence that short contamination events should be taken into consideration when monitoring water quality.

5. Conclusion

The results of the present study add further evidence about the use of the MN assay as a relevant biomarker for water quality monitoring when used with AO staining. Statistical analyses revealed that fluorescent AO staining is better adapted to piscine erythrocyte MN assay than classical Giemsa staining. DNA-specific staining reduces false-positive MN scoring due to artefacts. This provides higher reliability and sensitivity for the assay. In addition, the scoring process is faster. The sensitivity of the MN assay using AO is validated by the field experiment. The mutagenic potential of a spring flood in the Save river was investigated. In such an agricultural watershed, where the main crops are corn, wheat, and sunflower, spring floods are heavily contaminated by pre-emergent herbicides transported from field to stream by surface runoff. Significant MN induction was detected in fish exposed to flood water under our experimental conditions. This mutagenicity is most likely associated with the short pulse of herbicides as no such results were observed with water sampled during basal flow. This contribution to the optimization of the MN assay highlights (i) the advantages of using AO rather than Giemsa staining and (ii) the applicability of the assay for monitoring biological impacts of short contamination events in the field.

Acknowledgments

This research was supported by the grant no. 26138 from the French ministry of Higher Education and Research. The authors are thankful to Peter Winterton for his critical reading of the English of the manuscript.

References

- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121–135.
- Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102, 9–12.
- Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 42–52.
- Ayllon, F., Garcia-Vasquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467, 177–186.
- Balachandra Dass, S., Ali, S.F., 2004. Evaluation of γ -hydroxybutyric acid for genotoxicity in the mouse micronucleus assay. *N. Y. Acad. Sci.* 1025, 538–542.

- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat. Toxicol.* 78, 93–98.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., Devaux, A., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89, 197–203.
- Carrasco, K., Tilbury, K.L., Mayers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as in-situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47, 2133–2136.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81–91.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005a. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 107–111.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271.
- Cavas, T., Konen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.
- Cavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 352–358.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen* 29, 277–288.
- Costa, P.M., Costa, M.H., 2007. Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. *J. Fish Biol.* 71, 148–151.
- da Silva Souza, T., Fontanetti, C.S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* 605, 87–93.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquat. Toxicol.* 88, 88–94.
- de Campos Ventura, B., de Franceschi de Angelis, D., Aparecida Marin-Morales, M., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Phys.* 90, 42–51.
- Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Yamada, M., Inoue, Y., Kinae, N., 2007. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat. Res.* 627, 178–185.
- Depledge, M.H., 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. *Environ. Health Perspect.* 102, 101–104.
- Devault, D.A., G rino, M., Laplanche, C., Julien, F., Winterton, P., Merlina, G., Delmas, F., Lim, P., Sánchez-Pérez, J.M., Pinelli, E., 2009. Herbicide accumulation and evolution in reservoir sediments. *Sci. Total Environ.* 407, 2659–2665.
- Diekmann, B., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat. Toxicol.* 68, 27–37.
- Fenelon, J.M., Moore, R.C., 1998. Transport of agrichemicals to ground and surface water in a small central Indiana watershed. *J. Environ. Qual.* 27, 884–894.
- Ferenczi, J., Ambrus, A., Wauchope, R.D., Sumner, H.R., 2002. Persistence and runoff losses of 3 herbicides and chlorpyrifos from a corn field in the Lake Balaton watershed of Hungary. *J. Environ. Sci. Health B.* 37, 211–224.
- Frenzilli, G., Falleni, A., Scarcelli, V., Del Barga, I., Pellegrini, S., Savarino, G., Mariotti, V., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., Nigro, M., 2008. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquat. Toxicol.* 89, 188–196.
- Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet. Mol. Biol.* 23, 235–239.
- Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.* 518, 145–150.
- Hamada, S., Sutou, S., Morita, T., Wakata, A., Asanami, S., Hosoya, S., Ozawa, S., Kondo, K., Nakajima, M., Shimada, H., Osawa, K., Kondo, Y., Asano, N., Sato, S., Tamura, H., Yajima, N., Marshall, R., Moore, C., Blakey, D.H., Schechtman, L.M., Weaver, J.L., Torous, D.K., Proudlock, R., Ito, S., Namiki, C., Hayashi, M., 2001. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 3th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 93–110.
- Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate Jr, M., 1983. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.* 120, 241–247.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Sotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.* 399, 125–133.
- Heddle, J.A., Salamone, M.F., 1981. The micronucleus assay, 1, in vivo. In: Stich, H.F., San, R.H.C. (Eds.), *Short Term Tests for Chemical Carcinogens*. Springer Verlag, Berlin, pp. 243–249.
- Kanji, G.K., 2006. 100 Statistical Tests third ed. SAGE Publications.
- Kligerman, A.D., 1982. Fishes as a biological detector of the effects of genotoxic agents. In: Heddle, J.A. (Ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press, New York, pp. 435–453.
- Kuivila, K.M., Foe, C.G., 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco estuary, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1141–1150.
- Kurelec, B., 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35, 341–348.
- Lemos, C.T., Milan Rodel, P., Terra, N.R., D'Avila de Oliveira, N.C., Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391–401.
- Marques de Miranda Cabral Gontijo,  ., Barreto, R.E., Speit, G., Valenzuela Reyes, V.A., Luiz Volpato, G., Favero Salvadori, D.M., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.* 534, 165–172.
- Nercesyan, A., Kundi, M., Kambis, A., Schulte-Hermann, R., Knasm ller, S., 2006. Effect of staining procedure on the results of micronucleus assay with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1835–1840.
- Nishikawa, T., Haresaku, M., Fukushima, A., Nakamura, T., Adachi, K., Masuda, M., Hayashi, M., 2002. Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens. *Mutat. Res.* 513, 93–102.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 252–259.
- Richards, R.P., Baker, D.B., 1993. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie Basin. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 13–16.
- Rodríguez-Cea, A., Ayll n, F., García-Vázquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 442–448.
- Schulz, R., 2001. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens river, western cape, south Africa: importance of a single event. *Water Res.* 35, 1869–1876.
- Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Topic Popovic, N., Jadan, M., 2009. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 287–291.
- Taghavi, L., Probst, J.-L., Merlina, G., Marchand, A.-L., Durbe, G., Probst, A., 2010. Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montousse at Aurade, south west France). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 390–405.
- Talapatra, S.N., Banerjee, S.K., 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food Chem. Toxicol.* 45, 210–215.
- Tinwell, H., Ashby, J., 1989. Comparison of acridine orange and Giemsa stains in several mouse bone marrow micronucleus assays-including a triple dose study. *Mutagenesis* 4, 476–481.
- Tiveron, C., Russo, A., Bassani, B., Pacchierotti, F., 1996. Genotoxicity of trophosphamide in mouse germ cells: assessment of micronuclei in spermatids and chromosome aberrations in one-cell zygotes. *Mutagenesis* 11, 125–130.
- Udroiu, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.* 25, 235–240.
- Ugarte, M.D., 2008. Probability Statistics with R. Chapman & Hall.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S., Anderson, S.L., 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 2868–2877.
- Winter, M.J., Ellis, L.C.J., Hutchinson, T.H., 2007. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 629, 89–99.

La Save est un cours d'eau représentatif du réseau hydrographique des coteaux de Gascogne tant en terme de morphologie que d'occupation du sol. Le régime hydrologique est caractérisé par des crues associées aux précipitations intenses, notamment au printemps, lorsque les herbicides de prélevée sont appliqués sur les sols nus. C'est pourquoi ce site a été retenu pour étudier les épisodes courts de contamination associés aux crues.

Par ailleurs, si le test comète est suffisamment sensible pour étudier les réponses induites à la suite de telles expositions courtes, le test micronoyaux a du être validé dans nos conditions expérimentales. La durée d'exposition ainsi que la méthode de coloration ont ainsi été optimisées.

Chapitre 2. Impact mutagène pour le poisson des épisodes de crues dans le sud ouest de la France

1. Introduction

Lors des crues, les organismes non-cibles sont exposés à un mélange complexe de contaminants. Dans les cours d'eau Gascons, en raison de l'occupation des sols, ce mélange implique principalement des herbicides utilisés sur les grandes cultures, tels que les triazines, urées substituées et anilides. En plus de la contamination chimique, de nombreux paramètres environnementaux (taux de matière en suspension, débit) varient au cours des épisodes de crue. En considérant les interactions possibles i) entre les différents contaminants et ii) entre les contaminants et le milieu, l'impact biologique de la contamination associée à ces événements ne peut être appréhendé de façon satisfaisante sur la base des effets de chacune des molécules testées en conditions contrôlées.

Dans ce contexte, nous avons cherché à explorer l'impact biologique des crues et à évaluer la contribution de la contamination par les herbicides à cet impact. Pour cela, la stratégie repose sur la confrontation de plusieurs expérimentations, menées selon des protocoles d'exposition différents. Dans tous les cas, nous nous sommes attachés à mesurer la réponse biologique en terme de génotoxicité afin d'accéder à des biomarqueurs précoces, mais néanmoins pertinents écologiquement (cf paragraphe 3.4 de la partie I).

Dans un premier temps, le potentiel génotoxique de échantillons d'eau prélevés sur terrain a été mesuré sur un organisme modèle, le carassin (*C. carassius*). Trois situations hydrologiques différentes ont été évaluées : une crue d'hiver, une crue de printemps et un débit de base. Dans chaque cas, la contamination chimique de l'eau a été caractérisée au moyen d'analyses chimiques afin de mettre en relation l'intensité de la contamination et les effets observés. Dans cette situation, le mélange auquel sont exposés les poissons est réel, tant en terme de contaminants que de matière en suspension. En revanche, les conditions d'exposition sont semi-statiques (un renouvellement d'eau toutes les 24h) tandis que les poissons du milieu sont exposés à un flux de contaminants. Afin d'évaluer le rôle du mélange d'herbicides sur

les effets biologiques observés, nous avons ensuite exposé les poissons à un mélange expérimental d'herbicides. Celui-ci a été élaboré sur la base des analyses chimiques de la crue de printemps, et reprend les 5 molécules détectées en plus fortes concentrations ainsi que leur concentration moyenne lors des 4 jours de crue.

Dans un second temps, nous avons cherché à élargir la portée de l'étude en exposant les poissons non plus à un mélange reconstituant une crue précise, mais à un mélange synthétique, composé des molécules les plus concentrées lors de l'ensemble des épisodes de forte contamination. Une gamme de concentration a par ailleurs été testée afin d'explorer un éventuel effet-dose, et l'impact du glyphosate, non détectable par nos techniques d'analyses a été testé.

Enfin, dans le but d'apporter une plus grande pertinence écologique à ce travail, nous avons mesuré les réponses biologiques d'individus d'une espèce native, le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*), exposés à une crue en conditions réelles. La comparaison des mesures effectuées sur deux lots, l'un prélevé juste avant une crue, l'autre prélevé juste après permettra d'évaluer l'effet de celle-ci sur des organismes naturellement présents dans le milieu.

2. Etude expérimentale de l'impact génotoxique de la contamination par les herbicides associée aux épisodes de crue

Résumé

Lorsque des précipitations surviennent après l'application d'herbicides, le ruissellement intense conduit à une contamination des eaux de surface. Les organismes aquatiques sont alors brièvement exposés à un mélange complexe de contaminants. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact génotoxique de tels événements sur les poissons. Un organisme modèle, le carassin commun (*Carassius carassius*) a été exposé pendant 4 jours, en conditions contrôlées à de l'eau prélevée quotidiennement dans la Save (France). Le bassin versant de ce cours d'eau est représentatif des zones agricoles du sud-ouest de la France. Trois conditions hydrologiques ont été comparées : le débit de base, une crue d'hiver et une crue de printemps. Des analyses chimiques de l'eau échantillonnée ont confirmé la plus forte contamination de l'eau de crue de printemps, à laquelle contribue largement le métolachlore. La génotoxicité a été évaluée par le test des micronoyaux et le test comète dans les érythrocytes circulants. Une augmentation significative des dommages à l'ADN par rapport aux individus contrôles a été détectée par le test comète pour chaque condition d'exposition. Les dommages les plus importants ont été observés lors de l'exposition à l'eau prélevée lors de la crue de printemps. Cette condition est par ailleurs la seule pour laquelle une induction significative de MN a été détectée. Par ailleurs, des poissons ont été exposés pendant 4 jours à un mélange de 5 herbicides reconstituant la contamination observée lors de la crue de printemps. Des dommages modérés à l'ADN ont été observés, sans induction de MN. Ces résultats suggèrent donc que la mutagénicité induite par l'eau prélevée sur le terrain est donc le résultat de nombreuses interactions entre les contaminants, et entre les contaminants et les facteurs environnementaux. La pertinence de l'exposition aux mélanges réels est ainsi illustrée. Ces résultats révèlent l'impact mutagène de la contamination de l'eau lors des crues de printemps, justifiant la considération de ces épisodes courts dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité des eaux.

Mots clés: Génotoxicité; herbicides, crues de printemps; *Carassius carassius*, mélange de contaminants



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox



Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France

T. Polard^a, S. Jean^{a,*}, L. Gauthier^a, C. Laplanche^a, G. Merlina^a, J.M. Sánchez-Pérez^{a,b}, E. Pinelli^a

^a Université de Toulouse; INPT; UPS; ECOLAB (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle); Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT) Avenue de l'Agrobiopole BP 32607 Auzeville Tolosane 31326 CASTANET TOLOSAN Cedex, France

^b CNRS, ECOLAB (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle), 31326 Castanet-Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2010

Received in revised form

15 September 2010

Accepted 20 September 2010

Keywords:

Genotoxicity

Herbicides

Spring flood

Carassius carassius

Mixture

ABSTRACT

When heavy rainfall follows herbicide application, the intense surface runoff causes stream water contamination. Aquatic organisms are then briefly exposed to a complex mixture of contaminants. The aim of the present study is to investigate the genotoxic impact of such events on fish. A model fish, the Crucian carp (*Carassius carassius*) was exposed in controlled conditions, for 4 days, to water sampled daily in the Save River (France). The watershed of this stream is representative of agricultural areas in south-west France. Three hydrological conditions were compared: basal flow, winter flood, and spring flood. Chemical analysis of the water samples confirmed the higher contamination of the spring flood water, mainly explained by a peak of metolachlor. Genotoxicity was evaluated by micronucleus (MN) test and comet assay in peripheral erythrocytes. A significant increase in DNA breakdowns compared to controls was detected by the comet assay for all conditions. Exposure to spring flood water resulted in the highest damage induction. Moreover, induced chromosomal damage was only detected in this condition. In addition, fish were exposed, for 4 days, to an experimental mixture of 5 herbicides representative of the spring flood water contamination. Fish exhibited moderate DNA damage induction and no significant chromosomal damage. The mutagenicity induced by field-collected water is then suspected to be the result of numerous interactions between contaminants themselves and environmental factors, stressing the use of realistic exposure conditions. The results revealed a mutagenic impact of water contamination during the spring flood, emphasizing the need to consider these transient events in water quality monitoring programs.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite increasing awareness about stream water quality (EU Water Framework Directive – 2000/60/EC), pesticides are commonly used in agriculture. In Europe, 200,000 tonnes of plant protection active substances were used in 2003 (Eurostat, 2007). Herbicides represented 38% of this amount, and France alone accounted for 26% of herbicide consumption, mainly used on cereals and maize (Eurostat, 2007). As a consequence, herbicides are found in French surface water, as reported by water quality monitoring programs (IFEN, 2007). Data from such networks provide an overall vision of global chronic contamination. However, besides chronic contamination, streams undergo pulses of contamination and it is now acknowledged that short contamination events have

to be considered in the context of biological monitoring (Cold and Forbes, 2004; Whitehead et al., 2004). The highest concentrations of pesticides in agricultural streams occur during floods, when rainfall provides a major transport mechanism for pesticides through surface water runoff (Richards and Baker, 1993; Fenelon and Moore, 1998; Kuivila and Foe, 1995; Liess et al., 1999; Kreuger, 1998). This phenomenon is emphasized with rainfall occurring shortly after pesticide application. Because of the transience of these events they are not considered in the monitoring of water quality. In the Gascogne area, in south-west France, pre-emergent herbicide application in spring coincides with occasional heavy precipitation. Higher water contamination during such events has been demonstrated (Taghavi et al., 2010; Debenest et al., 2008). As a result, non-target organisms are briefly exposed to a mixture of herbicides which may induce genetic damage (Konen and Cavas, 2008; Clements et al., 1997). Moreover, interactions between contaminants may occur, affecting the overall water toxicity experienced by organisms in streams (Anderson and Lydy, 2002; Lydy and Linck, 2003). Evaluating the biological impact of brief contamination events thus requires the use of tools to integrate both temporal

* Corresponding author at: Université de Toulouse, INP-ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France. Tel.: +33 5 34 32 39 08; fax: +33 5 43 32 39 01.

E-mail address: severine.jean@ensat.fr (S. Jean).

variability and multiple sources of contamination. This supports the use of biomarkers. Biomarkers are defined as biological responses related to the exposure to environmental chemicals (Peakall, 1994). Among the numerous biomarkers used in the context of stream water monitoring (Van der Oost et al., 2003; Mayon et al., 2006), genotoxicity assessment is one of the most used tool (Udroiu, 2006; Rodriguez-Cea et al., 2003; Lemos et al., 2007). The micronucleus test (MN) and comet assay have been successfully used by numerous authors. Besides providing a quick molecular response, they are a way to investigate impact at a higher, and more ecologically relevant, biological scale (Anderson and Wild, 1994; Kurelec, 1993; Depledge, 1994; Diekmann et al., 2004).

Micronuclei are whole or partial chromosomes which have not been incorporated into the daughter nucleus following mitosis due to the clastogenic (chromosome breaking) or aneugenic (mitotic spindle dysfunction) effects of a chemical. An increase in MN frequency has been demonstrated to result from exposure to various compounds found in the aquatic environment (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996; Chaudhary et al., 2006; Klobucar et al., 2010; Lemos et al., 2007; Cavas and Ergene-Gozukara, 2003; Cavas and Ergene-Gozukara, 2005). MN induction indicates non-repairable mutagenicity and thus may be less sensitive than tests involving the occurrence of repairable strand breaks.

The single cell gel electrophoresis (comet assay) in alkaline conditions is a highly sensitive biomarker. It detects and quantifies DNA damage such as single- and double-strand breakage and alkali-labile sites (Tice et al., 2000). These types of damage can be induced directly by the contaminant, or indirectly via repair processes (Tice et al., 2000). The combination of comet assay and the MN test allows the detection of both the subtle repairable effects of genotoxic agents and established mutagenicity. Fish are highly suitable organisms to perform these two assays. They have been demonstrated to be sensitive to pesticides (Ali et al., 2009; Konen and Cavas, 2008; Grisolia, 2002) and their erythrocytes provide an easily accessible source of nucleated cells.

The aim of the present work was to investigate the biological impact of pulse herbicide contamination from agricultural runoff through genotoxicity assay in fish erythrocytes. In order to avoid the influence of physical parameters such as water flow, which can lead to stress susceptible to induce genotoxic responses beside contamination itself (Bombail et al., 2001; Winter et al., 2004; Pellacani et al., 2006), exposure took place in controlled conditions. Crucian carp, *Carassius carassius*, were used as model organisms. The fish were exposed to water sampled in the Save River, a tributary of the Garonne representative of the numerous agricultural streams in the Gascogne area. The potential genotoxicity of three different hydrological contexts were investigated. Water was first taken during a flood in winter, when contamination was expected to be low, second during a situation of basal flow and finally the mutagenicity of water from the first flood following herbicide application in spring was investigated. For each situation, water contamination was analysed and genotoxicity assayed. Finally, the effective genotoxicity of contaminants measured in higher concentrations in the spring flood was explored. Another group of fish was experimentally exposed to a mixture of the 5 most concentrated contaminants, at concentrations found to occur in the field.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All the chemicals and reagents used for genotoxicity assays, heparin salt (CAS No. 9041-08-1), benzocaine (CAS No. 94-09-7), acridine orange (CAS No. 10127-02-3), and methanol were

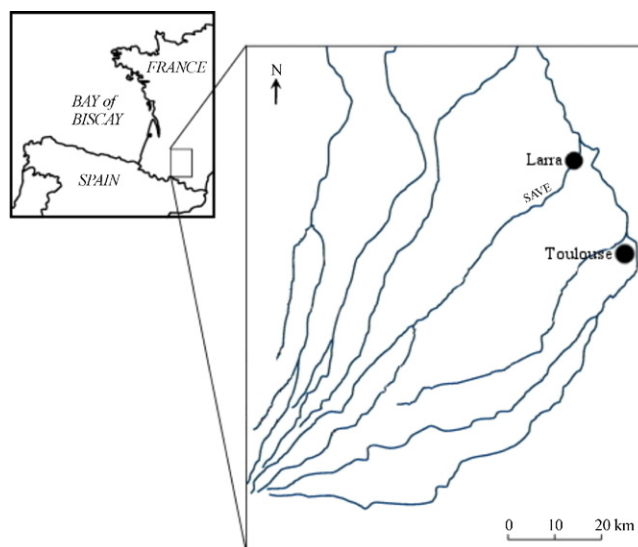


Fig. 1. France map highlighting the experimental site of Larra.

purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Pesticide analyses were performed using solvents of analytical grade (“pestipure” by SDS, Solvent Documents Syntheses, Peypin, France). Anhydrous sodium sulphate from SDS was used for drying the organic phases. Pesticide Mix44, used as reference material, and pure molecules, used for preparing the pesticide mixture, were purchased from Cluzeau Information Laboratory (CIL) (Sainte-Foy-la-Grande, France).

2.2. Experimental animals

The Crucian carp, *C. carassius* (Linnaeus, 1758; Cyprinidae) was chosen for its availability in a local hatchery. Specimens were aged 8–15 months, measuring 9.4 ± 0.7 cm, and weighing 12.5 ± 3 g. The fish were acclimated in filtered dechlorinated water in the rearing facilities for two weeks before the experiment. The fish were fed *ad libitum* before exposure and were not fed during exposure. The experiments were carried out in accordance with the European Ethical Guidelines, with the approval of the National Ethical Committee of the French Scientific Research National Centre (CNRS). Fish exposure and handling were conducted under the supervision of Dr. Laury Gauthier, holder of French animal handler's certificate no. 31-103, giving authorization to experiment on living vertebrates.

2.3. Experimental site

The Save River is a tributary of the Garonne located in the Gascogne area of south-west France (Fig. 1). It is 140 km long and its watershed (1150 km²) is mainly under agriculture, with more than 75% of arable land. The main crops are maize, wheat, and sunflower, which require the use of pre-emergent herbicides. The hydrological regime is mainly pluvial with maximum discharge in May (the bi-annual flood discharge is $69 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) with low flow during summer ($1.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). The mean annual discharge is $6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. There is no major city on the watershed (density: $39.3 \text{ inhabitants/km}^2$), suggesting no significant impact of urban pesticide contamination. Sampling was conducted at Larra ($01^\circ 14' 40'' \text{ E} - 43^\circ 43' 40'' \text{ N}$), approximately 10 km upstream of the confluence of the Save river, consequently offering the maximum effective agricultural watershed.

Table 1

Herbicide concentration in the experimental mixture renewed daily for 4 days ($\mu\text{g L}^{-1}$). Data are shown as mean concentration and standard deviation.

	Metolachlor	Isoproturon	Chlorotoluron	Atrazine	DEA
Nominal concentration	1.29	0.24	0.14	0.04	0.02
Mean concentration t_{0h}	1.22 ± 0.21	0.23 ± 0.00	0.74 ± 0.12	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Mean concentration t_{24h}	1.01 ± 0.14	0.20 ± 0.00	0.45 ± 0.17	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02

t_{0h} refers to mean concentration right after each of the four renewals; t_{24h} refers to mean concentration after 24 h of exposure.

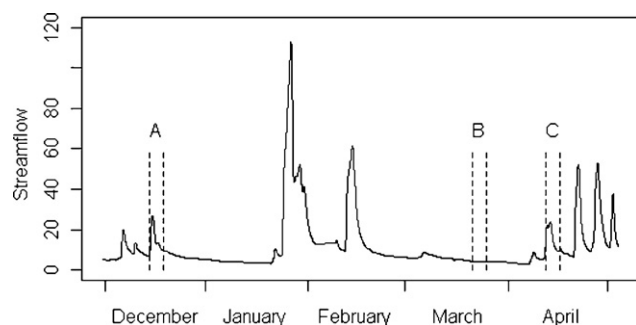


Fig. 2. Hydrograph of the Save River at Larra from December 2008 to April 2009. The line graph represents the stream flow ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$). Hatched lines delimit the sampling and exposure periods. A: winter flood; B: basal flow; C: spring flood.

2.4. Experimental design

Weather forecasts were checked to predict modifications of hydrological conditions. The first sampling was timed to coincide with an average winter flood (14/12/2008 to 18/12/2008), the second with a low-flow situation (21/03/2009 to 25/03/2009) and the third with the first major rainstorm event following application of pre-emergent herbicides (12/04/2009 to 16/04/2009) (Fig. 2). Both sampled floods were 4 days long, which is consistent with the average duration of a flood in the Save River (data 1994–2008). This duration fits with the time required to induce MN in *C. carassius* (Cavas and Konen, 2007). Save river water was taken daily for fish exposure and pesticides analysis.

2.4.1. Laboratory exposure to river water

The assays were carried out in 36-L tanks each housing 10 randomly selected fish. Exposure lasted 4 days with a parallel negative control (dechlorinated tap water). Water was taken at the experimental site and renewed daily in order to follow the changes in water composition during the given period of time and to minimize changes due to metabolism, complexation, and build-up of catabolites. The exposure water samples were gently warmed (water bath, 10 min) to match the rearing water temperature thus avoiding thermal shock for the fish. Water was artificially oxygenated and suspended particles did not sediment during the 24 h periods. Light exposure was maintained on a natural cycle.

2.4.2. Laboratory exposure to the experimental mixture

In an additional experiment, 10 fish in controlled conditions were exposed to a mixture of herbicides, prepared to mimic the water contamination during the spring flood. The five herbicides detected at highest concentration during the spring flood were used, and their nominal concentrations were based on their mean

concentration over the 4 days of the flood. The experimental mixture was composed of metolachlor $1.29 \mu\text{g L}^{-1}$, isoproturon $0.24 \mu\text{g L}^{-1}$, chlorotoluron $0.14 \mu\text{g L}^{-1}$, atrazine $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ and its metabolite deethylatrazine (DEA) $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$. The exposure lasted 4 days in 36-L exposure tanks and had parallel negative and positive controls (cyclophosphamide, 5mg L^{-1}). Contaminated water was renewed every 24 h. Herbicide concentration in the spiked water was checked twice a day, immediately after renewal and after 24 h of exposure. Effective herbicide concentrations are shown in Table 1.

2.4.3. Water chemistry and pesticide analysis

During each exposure sequence, physicochemical parameters (temperature, pH, conductivity) and flow were checked daily in the river (Table 2). The concentration of suspended solids was estimated by filtration of a 2 L water sample through a cellulose ester filter (Millipore, $0.45 \mu\text{m}$). Pesticide analysis was performed on 2 L raw water samples taken daily during each event. Extraction was performed following the procedure described by Devault et al. (2007). Briefly, liquid/liquid extraction was carried out with a dichloromethane/water ratio of 1:6 (V/V). Dichloromethane was then dried on anhydrous sodium sulphate and evaporated to dryness under vacuum. Finally, the dry residue was taken up in 2 mL of hexane. The contaminants were identified on a gas chromatography column from Zebra ZB-5MS 30 m, 0.25mm i.d. , $0.25 \mu\text{m}$ film from Phenomenex® (Torrance CA) with Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) Trace GC 2000 coupled with a DSQ II mass detector. The chromatographic conditions are described by Taghavi et al. (2010). Samples were analyzed for the 20 herbicides and the 5 fungicides most frequently used on the crops in the area (Taghavi et al., 2010; Devault et al., 2007). The detection limit, based on a signal-to-noise ratio of 3 was estimated at $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.5. Genotoxicity assay

Blood samples were taken by cardiac puncture with heparinized syringes. Ten individuals were used for the MN test among which eight were also employed for the comet assay. Fish were anaesthetized with 0.12g L^{-1} benzocaine (Marques de Miranda Cabral Gontijo et al., 2003). Because of its higher sensitivity, the comet assay was completed before the MN assay.

The single-cell gel electrophoresis assay was performed according to Tice et al. (2000) with modifications. All the steps described were performed under red light to minimize additional UV-induced DNA damage. Freshly sampled erythrocytes were diluted in 0.5% low melting agarose (LMA) in PBS and then transferred onto degreased microscope slides dipped the day before in 1.6% normal melting agarose (NMA) for the first layer and freshly covered with $85 \mu\text{L}$ NMA. The agarose was allowed to set for 5 min on ice

Table 2

Physico-chemical parameters of the river water.

	Max flow ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	Average flow ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	Suspended matter (mg L^{-1})	t ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Conductivity ($\mu\text{S m}^{-1}$)	Oxygenation rate (%)
Winter flood 12–18 December 2008	26.7	15.5 ± 5.6	451.3	11.4 ± 0.3	8.02 ± 0.12	542.6 ± 25.5	92 ± 2
Low flow 21–25 March 2009	4.48	4.3 ± 0.1	17.5	16.5 ± 0.2	8.11 ± 0.34	583.3 ± 9.6	98 ± 5
Spring flood 12–16 April 2009	23.8	16.0 ± 5.6	340.0	17.3 ± 0.3	7.97 ± 0.05	571.2 ± 8.6	86 ± 10

before removing the cover glass. After agarose solidification, the slides were placed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris–HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) for 90 min. Alkaline DNA-unwinding was carried out in an electrophoresis chamber containing a freshly prepared buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) for 20 min and electrophoresis was performed in the same buffer for 20 min at 25 V and 350 mA. After staining with 75 μ L ethidium bromide (2 μ g mL⁻¹), observations were made under an epi-fluorescence microscope (Olympus® BX4) equipped with a U-MWB2 filter, at 400 \times magnification. DNA strand breakage was quantified as the tail DNA percentage using an image-analysis system (Komet 5.5; Andor Technology®). For each individual, two slides were coded and 50 cells analyzed on each slide. Clouds of DNA fragments were not considered for the analysis.

Micronucleus test was conducted on the same individuals as the comet assay. Blood was smeared onto 5 slides for each fish. After fixing in pure methanol for 15 min, the slides were allowed to dry in air. All the slides were coded, randomized and scored using a blind review by a single observer. Slides were stained with acridine orange with a drop of AO (0.003% in Dulbecco PBS), covered right before scoring with a cover glass (Ueda et al., 1992, adapted by Cavas and Ergene-Gozukara, 2005). Micronuclei, exhibiting the same yellow–green fluorescence as the nucleus were scored in 5000 cells/individual under an epi-fluorescent microscope (Olympus® BX4) equipped with a U-MWB2 filter, at 1000 \times magnification.

2.6. Statistical analysis

All results are presented as mean \pm standard error. For the exposure to the river water, the MN data were processed using a crossed two-way analysis of variance (ANOVA). Factors were treatment (exposed and negative control) and hydrological conditions (basal flow, winter flood, and spring flood). For the experimental exposure, the MN data were processed using an analysis of variance (ANOVA). Factor was treatment (exposed, negative control, and positive control). In each case, the dependent variable was

micronucleus frequency, weighted by the number of cells scored. For the exposure to the river water, the comet assay data were processed using a 3-way ANOVA. Factors were treatment (exposed and negative control), hydrological condition (basal flow, winter flood, and spring flood) and electrophoresis. For the experimental exposure, the comet assay data were processed using a 2-way ANOVA. Factors were treatment (exposed, negative control, and positive control) and electrophoresis. The dependent variable was tail DNA percentage. For both MN and comet assays the variables were ratios and were transformed in order to respect the assumption of normality and homoscedasticity of residuals. The assumption of normality and homoscedasticity of the residuals were tested through Shapiro–Wilk normality and Brown–Forsythe test, respectively. The Tukey pairwise comparison test was performed to test differences between samples and their respective controls. The induction rate was estimated by the ratio of MN frequency between exposed and control samples. All statistical analyses were performed using R (Ugarte, 2008).

3. Results

Physical and chemical properties of the water samples are shown in Table 2. The two floods (winter and spring) were similar in terms of flow (maximum and average) and amount of suspended solid. They contrasted with the basal flow condition. The pH, conductivity, and oxygenation showed no differences between the three hydrological contexts. Temperature increased slightly from December to April, justifying the use of a control fish sample for each exposure.

3.1. Water analysis

The chemical analysis results are shown in Table 3. The sums of the concentration of all 25 pesticides considered were 0.98 μ g L⁻¹, 0.27 μ g L⁻¹ and 1.82 μ g L⁻¹ for winter flood, basal flow, and spring flood, respectively. Five of the six most abundant pesticides in water were herbicides: metolachlor, isoproturon, chlorotoluron,

Table 3

Pesticide concentrations measured daily for 4 days of the event (μ g L⁻¹). Data are shown as minimum, maximum, mean concentration and standard deviation.

		Winter flood				Basal flow				Spring flood			
		Min.	Max.	Mean	S.D.	Min.	Max.	Mean	S.D.	Min.	Max.	Mean	S.D.
Metolachlor	H	nd	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.39	2.19	1.29	0.88
Isoproturon	H	0.17	0.34	0.25	0.07	0.12	0.19	0.15	0.03	0.15	0.37	0.24	0.09
Chlorotoluron	H	nd	0.80	0.30	0.38	nd	nd	–	–	nd	0.32	0.14	0.16
Tebuconazole	F	nd	0.56	0.22	0.25	nd	0.03	0.01	0.01	nd	0.03	0.01	0.01
DEA	H	nd	0.07	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	nd	0.03	0.02	0.02
Atrazine	H	nd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.08	0.04	0.03
Metobromuron	H	nd	0.23	0.06	0.11	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Acifluorfen	H	nd	0.04	0.02	0.02	nd	0.02	0.01	0.01	nd	0.02	0.01	0.01
Cyproconazole	F	nd	0.06	0.02	0.03	nd	nd	–	–	nd	0.06	0.02	0.03
Trifluraline	H	nd	0.01	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0.00	nd	0.03	0.01	0.01
Epoxyconazole	F	nd	0.01	0.01	0	nd	0.01	0.01	0.00	nd	0.02	0.01	0.01
Fluzilazole	F	nd	0.01	0.01	0	nd	nd	–	–	nd	0.02	0.01	0.01
Linuron	H	nd	0.02	0.01	0.01	nd	nd	–	–	nd	0.04	0.01	0.02
Metazachlor	H	nd	0.01	0	0	nd	nd	–	–	nd	0.01	0.01	0.00
Hexazinone	H	nd	0.01	0	0.01	nd	nd	–	–	nd	0.03	0.01	0.01
Cyanazine	H	nd	0.02	0.01	0.01	nd	0.01	0	0	nd	nd	–	–
Simazine	H	nd	0.02	0.01	0.01	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Alachlor	H	nd	0.01	0	0.01	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Monolinuron	H	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–	nd	0.02	0	0.01
Sebutylazine	H	nd	0.02	0.01	0.01	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Terbutylazine	H	nd	0.02	0.01	0.01	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Fenpropimorph	F	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Pendimethaline	H	nd	0.01	0	0	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Metoxuron	H	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Imazamethabenz	H	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–	nd	nd	–	–
Total				0.98				0.27				1.82	

H, herbicide; F, fungicide.

Table 4Frequency of micronuclei scored in circulating erythrocytes in control fish and in fish exposed to Save River water for 96 h (mean \pm standard error).

	Negative control	Exposed	Induction rate
Winter flood 12–18 December 2008	0.61 \pm 0.41 (8)	0.88 \pm 0.46 (10)	1.44
Low flow 21–25 March 2009	0.40 \pm 0.2 (10)	0.54 \pm 0.51 (9)	1.35
Spring flood 12–16 April 2009	0.44 \pm 0.15 (8)	1.28 \pm 0.47 (9)**	2.91

Data are shown as the mean total frequency for each treatment group, \pm standard deviation (n = number of fish).** Significant difference from the corresponding negative control group at the $p < 0.01$ level.

atrazine, and its metabolite DEA. The three main families of herbicides used in the watershed are represented by these 5 molecules: substituted ureas (isoproturon, chlorotoluron), triazines (atrazine and DEA) and amides (metolachlor). The other detected pesticides occurred at low concentrations. The main observation from this chemical analysis is the concentration peak of metolachlor during the spring flood. Its concentration was higher than any other pesticides measured in any other sample. It contributes to 70% of the total contamination of the spring flood water.

3.2. Genotoxicity assessment

3.2.1. Fish exposed to field collected water

The MN frequencies scored after exposure to water samples from Save River are shown in Table 4. All the control groups presented low MN frequencies (0.40–0.61‰). Taken together, the results demonstrated an increase of MN frequency in fish erythrocytes exposed to River Save water (ANOVA, $p < 0.01$). Post hoc test revealed significant induction of MN formation only in fish exposed to spring flood water ($\times 2.91$; $p < 0.01$). When fish were exposed to other Save water samples, no significant MN induction was detected ($p > 0.05$).

The DNA breakdown data, measured as the percentage tail DNA by comet assay, are presented in Table 5. DNA damage was significantly higher in all fish samples exposed to Save water than in control fish. Moreover, fish exposed to river water sampled during the spring flood expressed the highest DNA damage induction ($\times 2.82$).

3.2.2. Fish exposed to the experimental mixture

Fish exposed, in controlled conditions, to the experimental mixture (metolachlor 1.29 $\mu\text{g L}^{-1}$, isoproturon 0.24 $\mu\text{g L}^{-1}$, chlorotoluron 0.14 $\mu\text{g L}^{-1}$, atrazine 0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$, DEA 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$) did not

exhibit the genotoxic damage seen in the comet assay of fish exposed to spring flood water (Table 6). The induction of DNA damage measured by comet assay was significant ($\times 2.08$). The value is comparable to that measured in fish exposed to winter flood water. However, no significant MN induction was detected.

4. Discussion

4.1. Contamination pattern

The temporal pattern of agricultural stream water contamination is driven both by hydrological events and agricultural practices (Kadoum and Mock, 1978; Thurman et al., 1992; Pratt et al., 1997). In this study, the lowest total pesticide concentration occurred during basal flow (0.27 $\mu\text{g L}^{-1}$). The low contamination of water collected during the basal flow event can result from several weeks without rain, precluding surface runoff as a transport mechanism. In contrast, the winter flood occurred after successive rainfall events. The resulting washing off of applied pesticides from the field surface led to moderate contamination (0.98 $\mu\text{g L}^{-1}$). The spring flood presented the highest level of contamination (1.82 $\mu\text{g L}^{-1}$). This event happened following several weeks without rainfall (Fig. 2). Moreover, it coincided with increased herbicide application in this agricultural catchment. The higher water contamination (twice the total concentration measured in winter) results from the simultaneous transport of the pesticides applied during the preceding weeks. The molecules detected were mainly pre-emergent herbicides such as metolachlor, isoproturon, chlorotoluron, atrazine and its metabolite DEA. Such herbicides are used for weed control in crops including wheat, maize, and sunflower, accounting for most of the crops in the Save watershed. This type of contamination is in accordance with previous studies concerning water contamination in the Gascogne area (Devault et al., 2007).

Table 5Level of the DNA damage measured by tail DNA percentage in circulating erythrocytes in control fish and in fish exposed to Save River water for 96 h (mean \pm standard error).

	Negative control	Exposed	Induction rate
Winter flood 12–18 December 2008	10.08 \pm 2.15 (4)	16.40 \pm 2.45** (4)	1.63
Basal flow 21–25 March 2009	15.42 \pm 1.95 (8)	17.39 \pm 2.06** (8)	1.13
Spring flood 12–16 April 2009	10.19 \pm 3.13 (8)	28.68 \pm 7.25*** (8)	2.82

Data are shown as the tail DNA percentage for each treatment group, \pm standard deviation (n = number of fish).** Significant difference from the corresponding control group at the $p < 0.01$ level.*** Significant difference from the corresponding control group at the $p < 0.001$ level (Tukey).**Table 6**Level of DNA damage measured by tail DNA percentage and frequency of micronuclei in circulating erythrocytes in control fish and in fish exposed to the experimental mixture for 96 h (mean \pm standard error).

	MN test		Comet assay	
	MN frequency (‰)	Induction rate	Tail DNA (%)	Induction rate
Negative control	0.64 \pm 0.45 (8)		8.04 \pm 1.36 (8)	
Positive control	1.43 \pm 0.80* (6)	2.23	18.43 \pm 4.12** (7)	2.29
Experimental mixture	0.50 \pm 0.26 (8)	0.78	16.76 \pm 1.33** (8)	2.08

MN test data are shown as the mean total frequency for each treatment group, \pm standard deviation; comet assay data are shown as the tail DNA percentage for each treatment group, \pm standard deviation (n = number of fish).* Significant difference from the corresponding negative control group at the $p < 0.05$ level.** Significant difference from the corresponding negative control group at the $p < 0.01$ level (Tukey).

and more precisely in the Montoussé river, a tributary of the Save (Taghavi et al., 2010). Metolachlor contributed most to the high contamination measured in the spring flood reaching concentrations of up to $2.19 \mu\text{g L}^{-1}$. The use of atrazine has been forbidden in France since 2003, but it remains among the frequently detected molecules in streams (28.1% of detection when tested for; IFEN, 2007). The detection of both atrazine and DEA, indicates that the contamination can be attributed both to the persistence and slow degradation of this molecule in the soil (Wiegand et al., 2001) and to marginal residual use. Tebuconazole was the only fungicide detected in significant amounts among the molecules we looked for. It is generally used on wheat and maize.

4.2. Genotoxicity

All fish exposed to Save water exhibited significant DNA breakdown compared to the controls. This reveals the genotoxic potential of the Save stream in a context of possible chronic contamination. Moreover, genotoxicity measurements are in accordance with the temporal contamination pattern brought to light by the chemical analysis of the river water. DNA breakdown, detected by the comet assay, was the lowest during basal flow and the highest during spring flood. The MN assay results confirmed the higher genotoxic impact of the water during spring flood: it was the only exposure condition which induced significant MN formation. The level of oxygen, conductivity, and pH of the water were almost identical at the three sampling times. It is unlikely that they affected the assay results significantly. Previous studies demonstrated the impact of temperature on genotoxicity assay responses (Moraes de Andrade et al., 2004). However, the temperature variation in this study was low compared to the high range of temperatures *C. carassius* can withstand (from 0°C to 36°C ; Horoszewicz, 1973). In addition, it is important to point out that water sampled *in situ* was gently warmed to reach the temperature of water in which the fish were kept in the rearing facilities. Heat-shock, inducing genotoxic damage (Anitha et al., 2000), was then avoided. Due to field runoff from heavy rainfall, flood water presents an increase of suspended matter resulting from alluvial terraces and tertiary clay-rock slope erosion (Bornand et al., 1989). The winter flood exhibited slightly higher suspended matter concentrations than spring flood, but did not induce MN formation. Direct impact of clay on mutagenicity can thus be excluded. These results suggest an increased genotoxic potential of stream water associated with the pulses of contamination occurring during runoff events.

Genotoxicity in fish associated with agricultural runoff has already been demonstrated using the comet assay in previous studies (Whitehead et al., 2004; Bony et al., 2008). Based on data from the literature, the genotoxicity of the molecules detected in higher concentrations during spring flood remains unclear. Clements et al. (1997) showed induction of DNA damage in *Rana catesiana* tadpoles exposed by immersion to a commercial formulation of metolachlor (Dual-960E) at 0.272 mg L^{-1} , but Grisolia and Ferrari (1997) concluded to non-mutagenicity in mice after injection of metolachlor at concentrations up to 40 mg kg^{-1} . No genotoxicity associated with exposure to isoproturon was detected, either in the mouse bone-marrow micronucleus test (Gebel et al., 1997) or by the comet assay and the chromosomal aberration test in Chinese Hamster ovary cells (Vigreux et al., 1998). In contrast, Behera and Bhunya (1990) and Chauhan et al. (2001) revealed the genotoxic impact of isoproturon, which was the second most concentrated herbicide during spring flood. Chlorotoluron was the third most concentrated herbicide in spring flood water. Based on the literature, chlorotoluron and its metabolites have shown no evidence of genotoxicity (European Commission, 2005). In addition, in our study, the chlorotoluron concentration, which was highest in the winter flood water, did not induce MN formation. Atrazine has

been under focus in many genotoxicity studies, and the results are often conflicting. Atrazine genotoxicity has been pointed out using many tools, such as flow cytometry (Biradar and Rayburn, 1995a,b), drosophila wing-spot assay (Torres et al., 1992), and electronic DNA-biosensor (Oliveira-Brett and da Silva, 2002). Micronucleus test and comet assay have also shown DNA damage induction by atrazine (de Campos Ventura et al., 2008; Chang et al., 2005; Clements et al., 1997; Conners and Black, 2004; Ribas et al., 1995). In contrast, other studies concluded there was no atrazine genotoxicity (Kligerman et al., 2000a,b; Freeman and Rayburn, 2004) or marginal genotoxicity (Tennant et al., 2001; Gebel et al., 1997; Rayburn et al., 2001). Data concerning DEA are scarce. Using the Microtox method, it has been demonstrated to be less toxic than atrazine (Kross et al., 1992), but no genotoxicity data are available. The other herbicides were measured at low concentrations and are unlikely to be responsible for MN induction in fish.

To determine the implications of these molecules in the genotoxic effects of spring floods, a complementary experiment was performed in controlled conditions. Fish were exposed to a mixture of the five herbicides detected at the highest concentrations during the mutagenic spring flood. The genotoxicity measured (Table 6) did not match the results of the exposure to the spring flood water. The DNA breakdown measured with the comet assay was significant but lower than compared to the spring flood, and no MN induction was detected. The comet and MN assays bring to light different genetic damage. The comet assay can detect less severe and repairable DNA damage, such as single and double strand breakage (Tice et al., 2000). Alkali-labile sites are also detected as they are expressed as single-strand breaks in alkaline conditions (Tice et al., 2000). This assay does not require cell division to reveal damage. DNA breakdown occurring at all phases of the cell cycle, including in circulating erythrocytes, can then be quantified. In contrast, MN formation occurs during cell division (Al-Sabti and Metcalfe, 1995). It can result from two events. Chromosomal breakage and/or dysfunction of the mitotic spindle, both can lead to an incomplete distribution of chromosomes in daughter cells during mitosis. MN frequency in peripheral erythrocytes is then the result of the dynamic balance between the formation of micronucleated cells and their elimination. The detection of a modification of basal MN frequency reveals the alteration of one or both of these processes. The input of erythrocytes in circulating blood can be caused either by the production of new cells by the cephalic kidney or, under stressful conditions, by the release of cells stored in the spleen. An increased production of micronucleated cells could be explained by an aneugenic and/or a clastogenic impact in the erythropoietic organ during the duration of cell differentiation. In the present study, the clastogenic potential of the mixture has been demonstrated by the comet assay. The cells which are involved in the differentiation process during the 4-day exposure are then susceptible to be micronucleated. Splenic contraction has been demonstrated in fish in response to exercise and hypoxia (Yamamoto, 1987; Lai et al., 2006) and more recently to metal contamination (Witeska, 2005). In the frame of our study, no argument supports the hypothesis of a higher MN frequency in the cells stored in spleen compared to circulating erythrocytes. Then, such a release is unlikely to induce an increase in total MN frequency. Beside micronucleated cells formation, the rise in MN frequency could be caused by a decrease in micronucleated cells elimination, either through apoptosis or MN removal. Decordier et al. (2002) demonstrated that micronucleated cells can undergo apoptosis. An inhibition of this process would then lead to an increase in MN frequency. To our knowledge, no experimental data support such inhibition of apoptosis by contaminant exposure. Splenic removal of micronucleated cells has been demonstrated in mammals (Ramirez-Munoz et al., 1999; Cristaldi et al., 2004). In the review published in 2006, Udrouil highlighted the

fact that this removal mechanism involves the interendothelial slits of sinusal spleen, and conclude that the application of the test is not compromised in fish as their spleen is non-sinusal. Furthermore, the balance between the processes which are driving the MN frequency may vary in time. Previous studies suggested that the exposure to contaminants inhibits erythropoiesis (Das and Nanda, 1986; Dinnen et al., 1988). Consequently, less erythroid stem cells are undergoing differentiation into potentially micronucleated erythrocytes. The MN formation is then lowered, leading to a shift in the equilibrium. As a result, the peak of micronucleated erythrocytes is observed between 1 and 5 days after exposure to contaminants (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Udroui, 2006). This duration is short compared to the average life span of circulating erythrocytes which has been estimated at 51 days for *C. auratus langsdorfii* (Fischer et al., 1998). In fact, the results from the experimental exposure indicated that the increased MN frequency measured in fish exposed to the spring flood water cannot be exclusively attributed to the five herbicides tested alone, even if they represent the major part of the contamination detected. Other parameters must be involved in the higher mutagenicity of the spring flood water.

Sorensen et al. (2005) highlighted the interaction between clay and pesticide genotoxicity. The genotoxicity of pesticides can be either enhanced (dicamba) or lowered (oxamyl) by the molecule–clay interaction. As no suspended particles were present in the water of the experimental exposure, such interactions were not possible. This dissimilarity between field water and the experimental mixture may explain part of the divergence of the results. A direct mutagenic impact of clay is unlikely, as no MN induction was detected during the winter flood, but an interaction with the contaminant mixture present in the spring water can be suspected.

Numerous environmental and biological processes can modify the original molecule and, consequently, its toxicity. Osano et al. (2002) demonstrated that the genotoxic potential of metolachlor increased with its degradation. A stable aniline degradation product of metolachlor (2-ethyl-6-methylaniline) exhibits higher toxic effects than the parent molecule. Metabolites resulting from the degradation of every detected molecule could be present in the Save water, but were not included in the experimental mixture. Moreover, we cannot exclude that molecules which were unsuspected *a priori* were actually present in the Save. The glyphosate and diuron require specific analytical processes. Because they were not expected in such an agricultural stream, they were not looked for in our study. However, diuron and glyphosate are present in French streams. The detection rates were respectively 31.3% and 25.9% in 2006 (IFEN, 2007). Based on the literature, diuron appears genotoxic at high concentrations (Canna-Michaelidou and Nicolaou, 1996; Agrawal et al., 1996). It has been suspected to induce DNA breakdown in fish (Bony et al., 2008). In controlled conditions, glyphosate has been demonstrated to be genotoxic in fish. DNA breakdown was detected in *Prochilodus lineatus* (Cavalcante et al., 2008), and MN induction and DNA breakdown has been demonstrated in *Carassius auratus* (Cavas and Konen, 2007). Nevertheless, the concentrations tested in these studies (5–15 mg L⁻¹ and 10 mg L⁻¹ respectively) were significantly higher than those encountered in French rivers (maximum 17 µg L⁻¹ in 2005; IFEN, 2007). Finally, due to the complexity of realistic environmental mixtures tested, chosen in order to favour the ecological relevancy of the study, the causes of the higher mutagenicity observed in spring flood can not be fully identified.

In conclusion, detecting the contaminants in an exhaustive way and mimicking the full complexity of field contamination in controlled conditions seems unrealistic. The present results point out the challenge of predicting and evaluating the biological impact of contaminants in field conditions. However, the experimental design used in the present study made it possible to demonstrate

the mutagenicity of a brief exposure to an environmental mixture. Moreover, the increased genotoxicity associated with a pulse of contamination in an agricultural stream is highlighted. By altering the genetic integrity of the aquatic organisms, these events may represent a threat for aquatic ecosystems.

Acknowledgements

This work was performed within the framework of the EU Interreg SUDOE IVB program (SOE1P2F146 AguaFlash project, <http://www.aguaflash-sudoe.eu>) and funded by ERDF, Midi-Pyrénées Region and by the grant no. 26138 from the French ministry of Higher Education and Research. The authors are grateful to Peter Winterton for his critical reading of the English manuscript.

References

- Agrawal, R.C., Kumar, S., Mehrotra, N.K., 1996. Micronucleus induction by diuron in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 89, 1–4.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 650–656.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121–135.
- Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Persp.* 102, 9–12.
- Anderson, T.D., Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1507–1514.
- Anitha, B., Chandra, N., Gopinath, P.M., Durairaj, G., 2000. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish *Carassius auratus*. *Mutat. Res.* 469, 1–8.
- Behera, B.C., Bhunya, S.P., 1990. Genotoxic effect of isoproturon (herbicide) as revealed by three mammalian *in vivo* mutagenic bioassays. *Indian J. Exp. Biol.* 28, 862–867.
- Biradar, D.P., Rayburn, A.L., 1995a. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *J. Environ. Qual.* 24, 1222–1225.
- Biradar, D.P., Rayburn, A.L., 1995b. Flow cytogenetic analysis of whole-cell clastogenicity of herbicides found in groundwater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 13–17.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., 2001. Application of the comet and the micronucleus assays to butterflyfish (*Phyllis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44, 383–392.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., Devaux, A., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89, 197–203.
- Bornand, M., Arrouays, D., Baize, D., Jarnagne, M., 1989. Methodological framework of a regional cartography of the grounds on a scale of 1/250 000e. *Sci. Sol.* 27, 17–20 (in French).
- Canna-Michaelidou, S., Nicolaou, A.-S., 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox™ test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *Sci. Total Environ.* 193, 77–735.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41–46.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81–91.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 107–111.
- Cavas, T., Konen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 2, 263–268.
- Chang, L.W., Toth, G.P., Gordon, D.A., Graham, D.W., Meier, J.R., Knapp, C.W., Denoyelles, F.J., Campbell, S., Lattier, D.L., 2005. Responses of molecular indicators of exposure in mesocosms: common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicides alachlor and atrazine. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 190–197.
- Chaudhary, R., Pandey, S., Kushwaha, B., Gaur, K.K., Nagpure, N.S., 2006. Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. *J. Ecophysiol. Occup. Health* 6, 143–147.
- Chauhan, L.K., Saxena, P.N., Gupta, S.K., 2001. Evaluation of cytogenetic effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium sativum*. *Biomed. Environ. Sci.* 14, 214–219.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 277–288.
- Cold, A., Forbes, V.E., 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat. Toxicol.* 67, 287–299.

- Conners, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–371.
- Cristaldi, M., Ieradi, L.A., Udroui, I., Zilli, R., 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutat. Res.* 559, 1–9.
- Das, R.K., Nanda, N.K., 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res.* 175, 67–71.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquat. Toxicol.* 88, 88–94.
- de Campos Ventura, B., de Franceschi, D., Aparecida Marin-Morales, M., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 42–51.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, N., Kirsch-Volders, M., 2002. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* 17, 337–344.
- Depledge, M.H., 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. *Environ. Health Persp.* 102, 101–104.
- Devault, D.A., Merlina, G., Lim, P., Probst, J.-L., Pinelli, E., 2007. Multi-residues analysis of pre-emergence herbicides in fluvial sediments: application to the mid-Garonne River. *J. Environ. Monitor.* 9, 1009–1017.
- Diekmann, B., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations. II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat. Toxicol.* 68, 27–37.
- Dinnen, R.D., Tomlinson, S.M., Hart, D., Chopra, C., Heddle, J.A., 1988. Application of a micronucleus assay to the peripheral blood cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1607, 69–78.
- European Commission, 2005. Review Report for the Active Substance Chlorotoluron. Health and Consumer Protection Directorate-General, 54 pp.
- Eurostat, 2007. The Use of Plant Protection Products in the European Union, Data 1992–2003, 215 pp.
- Fenelon, J.M., Moore, R.C., 1998. Transport of agrichemicals to ground and surface water in a small central Indiana watershed. *J. Environ. Qual.* 27, 884–894.
- Fischer, U., Ototake, M., Nakanishi, T., 1998. Life span of circulating blood cells in gibeluna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish Shellfish Immunol.* 5, 339–349.
- Freeman, J.L., Rayburn, A.L., 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutat. Res.* 560, 69–78.
- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharter, R., Dunkelberg, H., 1997. *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Arch. Toxicol.* 71, 193–197.
- Grisolia, C.K., Ferrari, I., 1997. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate non-mutagenicity of the herbicide metolachlor. *Braz. J. Genet.* 20, 411–414.
- Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.* 518, 145–150.
- Horoszewicz, L., 1973. Lethal and “disturbing” temperatures in some fish species from lakes with normal and artificially elevated temperature. *J. Fish Biol.* 5, 165–181.
- IFEN, 2007. Les pesticides dans les eaux, Données 2005 (in French) 39 pp.
- Kadoun, A.M., Mock, D.E., 1978. Herbicide and insecticide residues in tailwater pits: water and pit bottom soil from irrigated corn and sorghum fields. *J. Agric. Food Chem.* 26, 45–50.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Zucker, R.M., 2000a. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. *In vitro* studies. *Mutat. Res.* 465, 53–59.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Peng, B.C., 2000b. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. *In vivo* micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 471, 107–112.
- Klobucar, G.I.V., Stambuk, A., Pavlica, M., Sertic Peric, M., Kutuzovic Hackenberger, B., Hylland, K., 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 19, 77–84.
- Konen, S., Cavas, T., 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 434–438.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227–251.
- Kross, B.C., Vergara, A., Raue, L.E., 1992. Toxicity assessment of atrazine, alachlor, and carbofuran and their respective environmental metabolites using Microtox. *J. Toxicol. Environ. Health* 37, 149–159.
- Kuivila, K.M., Foe, C.G., 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco estuary, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1141–1150.
- Kurelec, B., 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35, 341–348.
- Lai, J.C.C., Kakuta, I., Mok, H.O.L., Rummer, J.L., Randall, D., 2006. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *J. Exp. Biol.* 209, 2734–2738.
- Lemos, C.T., Milan Rodel, P., Terra, N.R., D’Avila de Oliveira, N.C., Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391–401.
- Lies, M., Schultz, R., Lies, M.H.-D., Rother, B., Kreuzig, R., 1999. Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Water Res.* 33, 239–247.
- Lydy, M.J., Linck, S.L., 2003. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 343–349.
- Marques de Miranda Cabral Gontijo, Á., Barreto, R.E., Speit, G., Valenzuela Reyes, V.A., Luiz Volpato, G., Favero Salvadori, D.M., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.* 534, 165–172.
- Mayon, N., Bertrand, A., Leroy, D., Malbrouck, C., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Goffart, A., Thomé, J.P., Kestemont, P., 2006. Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: a case study. *Sci. Total Environ.* 367, 715–731.
- Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M., 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutat. Res.* 367, 245–251.
- Moraes de Andrade, V., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.* 560, 57–67.
- Oliveira-Brett, A.M., da Silva, L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 717–723.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., Bleeker, E.A.J., 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamides and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 119, 195–202.
- Peakall, D.B., 1994. The role of biomarker in environmental assessment. 1. Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157–160.
- Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C., 2006. A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat. Toxicol.* 77, 1–10.
- Pratt, J.R., Melendez, A.E., Barreiro, R., Bowers, N.J., 1997. Predicting the ecological effects of herbicides. *Ecol. Appl.* 7, 1117–1124.
- Ramirez-Munoz, M.P., Zuniga, G., Torres-Bugarin, O., Portilla, E., Garcia-Martinez, D., Ramos, A., Cantu, J.M., Sanchez-Corona, J., 1999. Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Lab. Anim. Sci.* 49, 418–420.
- Rayburn, A.L., Bouma, J., Northcott, C.A., 2001. Comparing the clastogenic potential of atrazine with caffeine using Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Lett.* 121, 69–78.
- Ribas, G., Frenzilli, G., Barale, R., Marcos, R., 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat. Res.* 344, 41–54.
- Richards, R.P., Baker, D.B., 1993. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie Basin. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 13–16.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 442–448.
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E., Wagner, E.D., Plewa, M.J., 2005. Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 174–181.
- Taghavi, L., Probst, J.-L., Merlina, G., Marchand, A.-L., Durbe, G., Probst, A., 2010. Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montousse at Aurade, south west France). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 390–405.
- Tennant, A.H., Peng, B., Kligerman, A.D., 2001. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: *in vivo* studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutat. Res.* 493, 1–10.
- Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Meyer, M.T., Mills, M.S., Pomes, M.S., Kolpin, M.L., 1992. A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of the midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2440–2447.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1992. Genotoxicity of 4 herbicides in the drosophila wing-spot test. *Mutat. Res.* 280, 29–295.
- Udroui, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Wat. Sci. Technol.* 25, 235–240.
- Ugarte, M.D., 2008. Probability Statistics with R. Chapman & Hall.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vigieux, C., Poul, J.M., Deslandes, E., Lebailly, P., Godard, T., Sichel, F., Henry-Amar, M., Gauduchon, P., 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutat. Res.* 419, 79–90.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S., Anderson, S.L., 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 2868–2877.
- Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C., Pflugmacher, S., 2001. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 199–205.

Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., Chipman, J.K., 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat. Res.* 552, 163–175.

Witeska, M., 2005. Stress in fish—hematological and immunological effects of heavy metals. *Electron. J. Ichthyol.* 1, 35–41.

Yamamoto, K.-I., 1987. Contraction of spleen in exercised cyprinid. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A, 1083–1087.

3. Evaluation des effets associés à un mélange d'herbicides représentatif de l'ensemble des situations de crues dans les cours d'eau Gascons

3.1 Introduction

Dans le cadre de l'expérimentation précédente, l'objectif de l'exposition au mélange expérimental est d'isoler l'influence de la contamination par les herbicides sur les effets observés lors de la première crue du printemps 2009. Le mélange expérimental avait donc été élaboré dans le but de mimer la contamination observée. Cette contamination reflète donc une situation ponctuelle. Cependant, la contamination chimique varie d'une crue à l'autre. Afin d'appréhender l'impact des crues dans un cadre plus général, nous avons cherché à explorer le potentiel génotoxique des mélanges de contamination auxquels les poissons sont le plus fréquemment exposés au cours des épisodes de crue. Pour cela, un second mélange expérimental synthétique a été élaboré en considérant les molécules détectées, et leur concentration relative, au cours de l'ensemble des épisodes de contamination intense survenus lors de la période d'étude.

Par ailleurs, afin d'élargir le champ d'étude, le mélange a été testé sur une gamme de concentrations. Les poissons ont donc été exposés au mélange à la concentration moyenne observée, soit une charge totale en contaminants de $2,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ et à ce même mélange concentré 20 et 100 fois. Le mélange 20 fois concentré permettra d'appréhender les impacts potentiels lors des situations de forte contamination sur le territoire français. En effet, le rapport 2010 du Commissariat Général au Développement Durable fait état de concentration maximum de plusieurs microgrammes pour de nombreux phytosanitaires. Le mélange 100 fois concentré, correspondant à une charge totale en contaminants de $210 \mu\text{g.L}^{-1}$ permettra d'investiguer la relation dose-effet.

Enfin, le glyphosate n'a pu être analysé dans l'eau prélevée dans le milieu à laquelle les poissons ont été exposés. Son dosage requiert l'utilisation d'une technique particulière par dérivation qui n'a pas pu être mise en œuvre dans le cadre de cette étude. Or des études précédentes ont mis en évidence un impact génotoxique de cette molécule, et en 2007, les réseaux de surveillance nationaux ont détecté cette molécule dans plus de 20% des analyses. Afin d'évaluer son impact potentiel et sa contribution aux résultats précédemment observés, nous l'avons intégré à un mélange d'herbicides.

3.2 Matériel et méthode

3.2.1 Elaboration du mélange

Le mélange a été élaboré dans le but d'exposer les poissons aux conditions chimiques moyennes rencontrées lors des épisodes de forte contamination. Ces événements ont été identifiés sur la base des analyses chimiques de l'eau de la Save entre mars 2008 et novembre 2009. Le seuil au delà duquel la contamination a été considérée comme importante a été fixé à $1\mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des concentrations des 14 herbicides et fongicides dosés systématiquement au cours de la période d'étude. Cette valeur de seuil est inférieure à la limite déclassant les eaux de la classe « bonne » à « moyenne » dans le cadre de la grille SEQ-Eau. Les données de 20 analyses ponctuelles ont été retenues. Ces analyses correspondent aux épisodes de fort débit ($15\text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ en moyenne contre $8,8\text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ pour l'ensemble des analyses). Parmi les contaminants quantifiés lors de ces analyses, 7 molécules ont été retenues. La sélection de ces molécules s'est faite sur la base de leur fréquence de détection dans la Save, tout en cherchant à incorporer des molécules présentant un spectre de caractéristiques physico-chimiques large. Ces molécules sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques des molécules intégrées au mélange.

	Toxicité LC50-96h	Poids moléculaire	Solubilité mg/L	Koc	Kow
S-Metolachlore	$9,7 \pm 5,6$ (9)	283,80	493	190	3,4
Isoproturon	18,0 (?)	206,3	70,2	122	2,5
Linuron	$8,9 \pm 3,9$ (9)	249,11	64	341	3,0
Dea		187,63	3200	72	1,5
Aclonifen	0,67 (?)	264,66	1,4	5400	4,4
Pendimethaline	$94,3 \pm 171$ (4)	281,31	0,3	6700-29400	5,2
Tebuconazole	$5,3 \pm 0,8$ (3)	307,81	36	1000	3,7

La valeur de toxicité est la moyenne \pm écart-type d'estimation de LC50-96h obtenues sur diverses espèces de poissons. Le nombre d'études impliquées est, si possible, indiqué entre parenthèses.

La concentration moyenne de chacune de ces molécules a été calculée sur la base des 20 analyses retenues. Cette valeur a permis d'évaluer leur contribution relative dans le mélange. Le mélange a été élaboré en utilisant chacune des 7 molécules dosées selon leur concentration moyenne mesurée pour les analyses retenues. Le mélange a également été testé à des concentrations 20 fois et 100 supérieures (Tableau 5).

Tableau 5 : Concentrations des molécules dans le mélange

	[c] moyennes mesurées	x1	x 20	X 100
S-Métolachlore	0,59	0,6	12	60
Linuron	0,47	0,5	10	50
Isoproturon	0,30	0,3	6	30
Tebuconazole	0,31	0,3	6	30
Acclonifen	0,19	0,2	4	20
DEA	0,02	0,1	3	10
Pendimethaline	Nd	0,1	2	10
Σ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2	2,1	42	210

Le glyphosate a été intégré dans un mélange 20x fois concentré, dans les mêmes concentrations que le métolachlore, soit $12 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette concentration est proche de sa concentration maximale détectée dans les eaux de surface françaises ($17 \mu\text{g.L}^{-1}$; IFEN).

3.2.2 Design expérimental

Les carassins ont été exposés à ce mélange synthétique en conditions contrôlées, par lot de 10 individus par bac de 36L, dans des box thermostatés. Le milieu d'exposition a été renouvelé toutes les 24h. Les poissons n'ont pas été nourris pendant les 96h d'exposition. Cinq conditions ont été testées : le mélange expérimental dans les concentrations mesurées sur le terrain, 20 et 100 fois concentrées, un témoin négatif exposé à de l'eau non contaminée et un témoin positif exposé à un génotoxique de référence (cyclophosphamide monohydrate ; 5mg.L^{-1}). Les contaminants ont été apportés en solution concentrée dans de

l'acétone. Le volume d'acétone apporté représente moins de 0,03% du volume d'eau total. Chaque milieu a été renouvelé toutes les 24h pendant les 96h d'exposition. La température ($17,0 \pm 0,6^\circ\text{C}$), la conductivité ($287,5 \pm 21\mu\text{S}$) et le pH ($7,74 \pm 0,2$) de l'eau ont été mesurés avant et après chaque renouvellement du milieu. Chaque individu a été prélevé aléatoirement dans le pool de poissons.

Les tests de génotoxicité des comètes et des micronoyaux ainsi que les tests statistiques ont été effectués selon les protocoles décrits précédemment.

3.3 Résultats

Les niveaux de dommages à l'ADN quantifiés par le test comète pour chacun des lots sont présentés dans la figure 27.

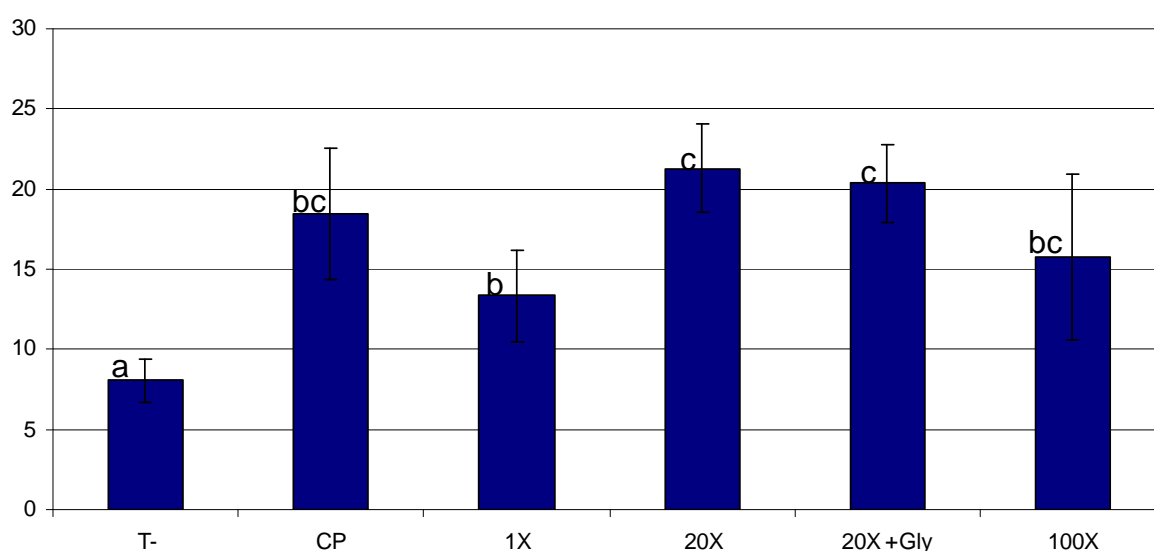


Figure 27 : Niveaux de dommage de l'ADN, mesurés par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes, chez les poissons exposés au mélange expérimental pendant 96h.

Les valeurs des témoins négatifs et positifs sont conformes à l'historique du laboratoire. Les moyennes sont significativement plus élevées pour chacun des lots exposés que pour le témoin négatif. Ceci révèle un impact génotoxique des conditions d'exposition, quelle que soit la concentration du mélange. Parmi les lots exposés, celui exposé au mélange réaliste est celui qui présente le taux de dommages le moins important. Des dommages significativement plus importants sont mesurés chez les individus exposés au mélange vingt fois concentré. La concentration du mélange a donc une influence sur la quantité de dommages induite à l'ADN des poissons exposés. En revanche, les dégâts mesurés chez les poissons

exposés au mélange 100x concentré ne sont pas différents des résultats observés pour les autres situations d'exposition. Par ailleurs, l'ajout de glyphosate ne modifie pas la génotoxicité du mélange vingt fois concentré.

Les fréquences de cellules micronuclées dénombrées dans chacun des lots exposés sont présentées dans la figure 28. A l'exception du témoin positif ($p < 0,05$), aucun lot exposé ne présente une induction significative de micronoyaux. La valeur moyenne de la fréquence de MN des individus exposés au mélange expérimental 100x est à peine inférieure à la valeur mesurée pour les témoins positifs. Cependant, à l'inverse de ce dernier lot, la différence n'est pas significative par rapport au témoin négatif. La grande variabilité entre les individus de ce lot (de 0 ‰ à 2,8 ‰) peut expliquer ce résultat. Les données de cette expérimentation sont à la limite de la validité des tests paramétriques (ANOVA) en ce qui concerne l'hypothèse de normalité ($p = 0,026$). L'ensemble des résultats a donc été également traité au moyen de tests non-paramétriques de Kruskal et Wallis, puis de Mann et Whitney pour détecter d'éventuelles différences deux à deux. Les résultats confirment en tout points ceux obtenus par l'ANOVA.

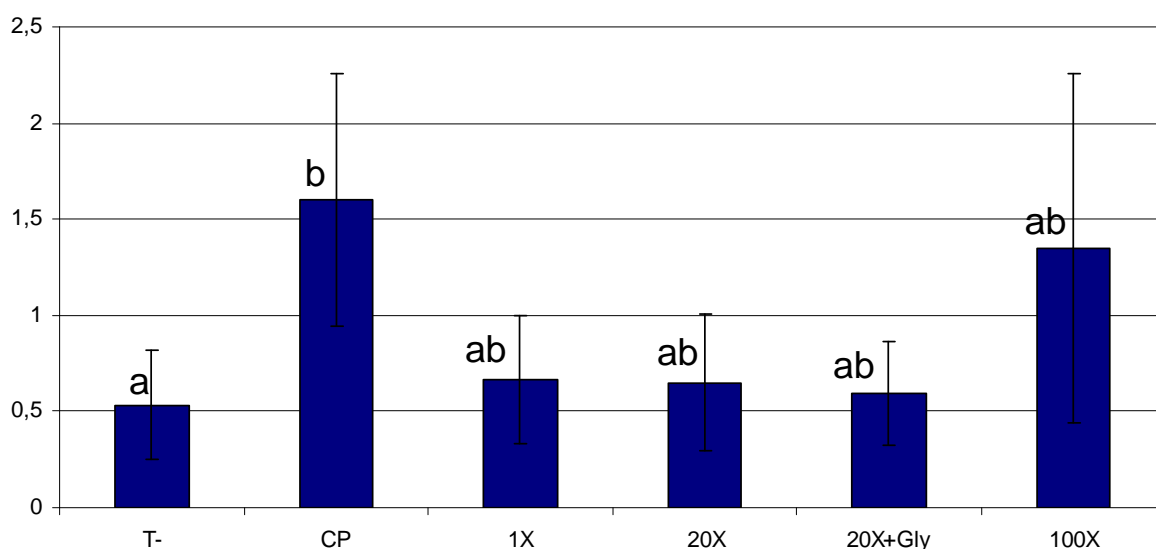


Figure 28 : Fréquences de micronoyaux (%) mesurées dans les érythrocytes circulants des poissons exposés au mélange expérimental pendant 96h. (Moyenne ± écart-type)

3.4 Discussion

Les résultats de cette étude confirment le potentiel génotoxique du mélange d'herbicides observé dans l'eau de la Save. En effet, même si aucune induction de MN n'est constatée dans ces conditions expérimentales, le test comète révèle des dommages à l'ADN pour chacun des lots exposés.

Le métolachlore et l'isoproturon faisaient déjà partie des herbicides testés dans le mélange précédent. Dans les deux cas, ces molécules étaient parmi les plus concentrées du mélange. Ces molécules font partie des plus détectées dans l'eau de surface en France (respectivement 5^{ème} et 6^{ème} herbicide les plus quantifiés, IFEN). Elles sont utilisées en traitement sur le maïs et le blé qui sont les cultures majoritaires sur le bassin de la Save. La génotoxicité de chacun de ces herbicides testé seul n'est pas clairement établie dans la littérature. En effet, les conclusions des études visant à évaluer leur potentiel génotoxique divergent (Clements et al., 1997 ; Grisolia et Ferrari, 1997 ; Gebel et al., 1997 ; Vigreux et al., 1998 ; Behera et Bhunya, 1990 ; Chauhan et al., 2001). Les conclusions ne sont pas d'avantage tranchées en ce qui concerne le linuron. Si une étude utilisant un test bactérien a montré que cette molécule pouvait induire des mutations (Epstein et Legator, 1971), ce résultat n'a pas été confirmé par les travaux ultérieurs (U.S. National Library of Medicine, 1995 ; Weed Science Society of America, 1994). Par ailleurs, d'après les conclusions des agences gouvernementales américaine et européenne, l'aclonifen, la pendimethaline et le tébuconazole ne sont pas considérées comme des molécules génotoxiques (EFSA Scientific Report, 2008 ; U.S. Environmental Protection Agency, 1987).

La génotoxicité du glyphosate a déjà été mise en évidence chez le poisson. Cavas et Konen (2007) ont observé des dommages génotoxiques, dont une induction de MN, chez des carassins dorés (*Carassius auratus*) exposés à du glyphosate à 10 mg.L⁻¹. Si le glyphosate est fréquemment détecté dans les eaux de surface française (25.9 % in 2006 ; Ifen, 2007), les concentrations mesurées demeurent bien inférieures à celles testées par Cavas et Konen. En 2007, la concentration maximale observée était de 17 µg.l⁻¹. Dans le cadre de notre précédente expérimentation, les poissons exposés à de l'eau prélevée sur la Save au cours d'une crue de printemps présentaient une induction de MN. Ce résultat

n'était pas observé pour les individus exposés à un mélange expérimental d'herbicides qui ne contenait pas de glyphosate. Cette molécule requérant un protocole d'analyse par dérivation ne pouvant être mis en œuvre au laboratoire, sa présence potentielle dans l'eau prélevée sur le terrain constituait une hypothèse susceptible de justifier les différences entre les résultats observés. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cherché à évaluer la génotoxicité du glyphosate en concentration réaliste, incorporé en mélange avec les autres molécules présentes dans le milieu. La concentration de glyphosate à laquelle nous avons exposé les poissons est proche de la concentration maximale observée en France ($12\mu\text{g.l}^{-1}$). A la suite des 4 jours d'exposition, aucune induction de MN n'a été constatée. De plus, la présence de glyphosate ne modifie pas les résultats de l'essai comète chez les individus exposés au mélange 20 fois concentré. Si la génotoxicité du glyphosate, seul et en forte concentration, a été observée dans des études précédentes (Cavas et Konen, 2007), nos résultats suggèrent que son impact n'est pas détectable dans nos conditions d'exposition. Ceci nous permet par ailleurs d'écarter le glyphosate comme étant à l'origine de l'induction des MN chez les poissons exposés à l'eau de la crue de printemps au cours de la précédente expérimentation.

Par ailleurs, l'exposition des organismes à une gamme de concentration nous a permis d'observer que la concentration des contaminants influe sur la quantité de dommages à l'ADN. En effet, les dommages mesurés par l'essai comète sont plus intenses quand les individus sont exposés à une charge totale en contaminant de $42\mu\text{g.L}^{-1}$ que lorsqu'ils sont exposés au mélange à des concentrations observées en moyenne sur la Save, à savoir $2,1\mu\text{g.L}^{-1}$. En revanche, les dégâts observés pour la concentration maximale testée, soit $210\mu\text{g.L}^{-1}$, sont intermédiaires. Ce résultat illustre la complexité de l'intégration biologique de l'exposition aux contaminants. Dans le cas de l'essai comète, les effets observés ne résultent pas uniquement d'un impact direct du contaminant sur la molécule d'ADN. Les facteurs biologiques tels que la mise en œuvre des processus de réparation ou la génération d'agents oxydants sont susceptibles d'être responsables d'un impact indirect ou d'une modulation de l'impact direct des contaminants (Lee et Steinhert, 2003 ; Jha, 2008).

Les processus de réparation qui peuvent être induits lors d'une exposition engendrent des cassures de brins. Dans certaines conditions de toxicité, l'inhibition des mécanismes de réparation peut donc se traduire par une réduction de la

migration. L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse d'ADN (aphidicoline, cytosine arabinoside par exemple) permettrait de bloquer les mécanismes de réparation (Speit et Hartmann, 1995). Il serait ainsi possible d'évaluer les dégâts provoqués par l'exposition au contaminant indépendamment des mécanismes de réparation.

Par ailleurs, la mise en œuvre des mécanismes de métabolisation peut être influencée par la concentration des contaminants. Dans la mesure où ces mécanismes sont impliqués tant dans la détoxification que dans l'activation métabolique de certains composés et la génération de conditions de stress oxydant, la modulation de la réponse génotoxique mesurée peut alors être négative ou positive. De plus, au sein même du lot exposé à la charge en contaminant la plus forte, la variabilité de réponse inter-individuelle est forte. D'après Mitchelmore et Chipman (1998) la variabilité de la réponse peut-être attribuée à l'état physiologique de chaque individu, notamment concernant le statut antioxydant, la capacité métabolique ou le potentiel de réparation de chaque cellule. Cette variabilité est par ailleurs plus importante dans le cas des contaminants présentant un effet indirect.

4. Evaluation *in situ* de l'impact génotoxique des crues sur poissons natifs

4.1 Introduction

Les expositions impliquant des mélanges expérimentaux ou de l'eau prélevée sur la Save nous ont permis d'appréhender la contamination des organismes par les herbicides ainsi que leurs effets génotoxiques. Cette démarche a mis en évidence l'influence de la complexité du mélange. Ainsi, nous avons observé qu'une exposition à un mélange représentatif de contaminants ne permettait pas de prédire les effets d'une exposition à un mélange complexe environnemental. Néanmoins, selon ce protocole, certains paramètres environnementaux n'ont pu être considérés. Ainsi le débit du cours d'eau ne peut être reconstitué en conditions contrôlées, le flux de contaminants étant alors remplacé par une exposition statique. De plus, le milieu de contamination a été renouvelé par pas de temps de 24h, tandis qu'il évolue en continu dans le milieu. C'est pourquoi, nous avons cherché à franchir une étape supplémentaire vers une plus grande pertinence écologique en mesurant les effets génotoxiques chez des individus exposés sur le terrain.

Dans le contexte de l'étude d'évènements courts tels que les crues, la technique d'encagement offre des avantages indéniables (Oikari, 2006). Cette méthode consiste à maintenir des individus en cage sur le terrain. Contrairement aux prélèvements d'individus sur le site, il est alors possible de contrôler la durée d'exposition et de lever les incertitudes quant aux déplacements des organismes entre des zones plus ou moins contaminées du milieu. L'espèce, ainsi que les caractéristiques des individus exposés (âge, sexe, taille...) peuvent également être contrôlées. Le carassin commun (*C. carassius*), utilisé en tant qu'organisme modèle lors des expositions en laboratoire n'est pas naturellement présent dans les cours d'eau gascons. De plus, ce poisson n'est pas adapté aux forts courants. C'est donc un cyprinidé rhéophile, le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) qui a été utilisé dans le cadre de ces expositions. Afin d'évaluer le potentiel génotoxique d'une crue, deux lots de poissons ont été encagés. C'est la comparaison des réponses biologiques des lots relevés juste avant et juste après une crue qui permettra d'évaluer l'impact de celle-ci.

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 Le modèle biologique

Le barbeau fluviatile (*Barbus barbus* L. 1758) est un cyprinidé rhéophile (Figure 29) Benthopélagique, il se nourrit principalement sur le fond. Il est donc en contact étroit avec le sédiment. Son comportement grégaire ainsi que son mode de vie benthique en font un organisme de choix pour des expérimentations d'encagement.



Figure 29 : Le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) (source :Direction de l'économie publique du canton de Berne)

Son aire de répartition s'étend depuis le nord des Pyrénées et des Alpes jusqu'à la mer baltique au nord, et jusqu'à l'Oural à l'est (figure 30).

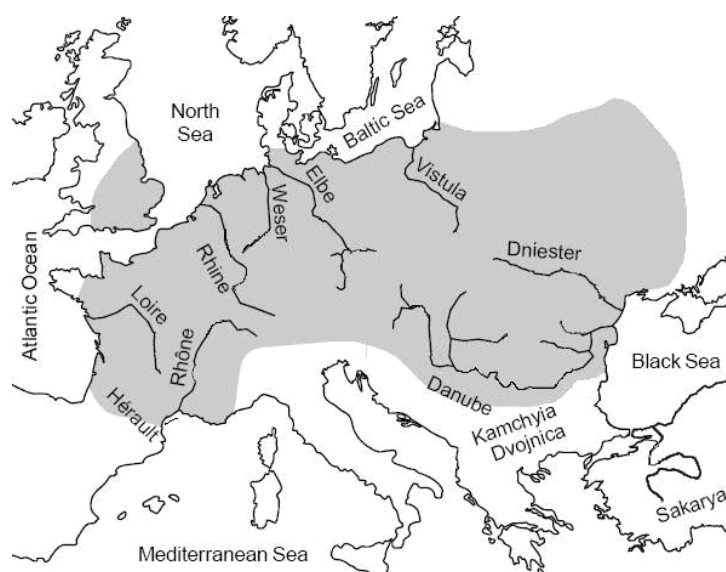


Figure 30 : Aire géographique de répartition du barbeau fluviatile (Adapté de Lelek, 1987 dans Kotlik et Berrebi, 2001)

On le retrouve le plus souvent dans les zones d'eau courante, peu profondes et oxygénées. Il est présent dans les cours d'eau du sud-ouest de la France tels que la Save. Cependant, la population étant trop réduite sur ce cours d'eau pour pouvoir échantillonner un nombre suffisant d'individus homogènes en taille, les individus ont été prélevés sur un cours d'eau voisin, le Touch. Les bassins versants du Touch et de la Save sont très semblables, tant en terme de surface que d'occupation du sol. L'échantillonnage a été effectué par pêche électrique, autorisée par arrêté préfectoral, au moyen d'un appareil de type « martin-pêcheur » (DREAM électronique®). Les poissons prélevés mesuraient $18,6 \pm 2,3$ cm et pesaient 49 ± 18 g. Des mesures par scalimétrie ont permis d'estimer que ces poissons étaient âgés de 30 à 42 mois (classes 2+ et 3+).

Après leur capture, les poissons ont été maintenus en stabulation au laboratoire pendant 5 semaines avant de procéder aux expérimentations d'encagement. Au cours de cette période, ils ont été maintenus dans une eau filtrée sur filtre à sable et à charbon, oxygénée par chute d'eau et nourris *ad libitum*.

4.2.2 Protocole d'encagement

Les cages ont été placées sur le site de Larra, sur la Save (cf Paragraphe 1.1 de la partie II). Celles-ci étaient formées d'une armature de métal garnie de grillage en plastique (35*25*75cm) et étaient ancrées par leur base la plus large sur le sédiment (Figure 31). Afin d'imiter le comportement des poissons et de limiter la puissance du courant auquel les poissons ont été exposés lors des crues, les cages ont été installées à l'intérieur d'un méandre.



Figure 31 : Cages installées sur le site de Larra

Dans le cadre de cette expérimentation, les poissons ont été répartis aléatoirement en quatre lots. Deux lots ont été maintenus en laboratoire tandis que les deux autres ont été placés en cages sur le site de Larra le 24 mars 2009 (Figure 32).

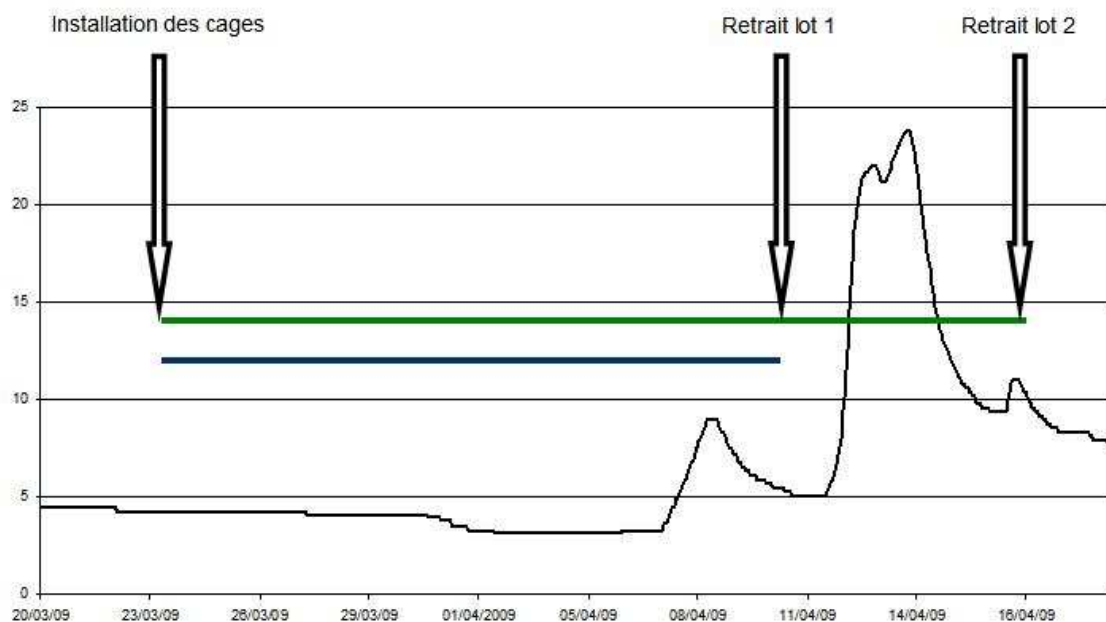


Figure 32 : Hydrogramme de la Save à Larra au cours des périodes d'exposition. La barre bleue représente la période d'exposition du lot 1 ; La barre verte représente la période d'exposition du lot 2.

Dix-sept jours après l'installation des poissons sur le site, un premier lot (E1) a été retiré à l'annonce de précipitations importantes, le 11 avril. Ces précipitations ont provoqué une crue entre le 12 et le 16 avril 2009. Cette crue correspond à la crue de printemps décrite dans le chapitre 2 de la partie II, au cours de laquelle des

échantillons ont été prélevés et transportés en laboratoire pour y exposer les carassins. Brièvement, la concentration totale en contaminants a été évaluée à $2,19 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les principaux herbicides détectés étaient le métolachlore et l'isoproturon. Le second lot (E2) a été prélevé à l'issue de la crue, le 16 avril. Les tests de génotoxicité (essai comète et MN décrits précédemment) ont été mis en œuvre sur chacun de ces deux lots en parallèle avec un lot témoins maintenu au laboratoire (T1 et T2)

4.3 Résultats

Les résultats de l'essai comète sont présentés dans la figure 33. Aucune différence significative n'est observée entre les différents lots.

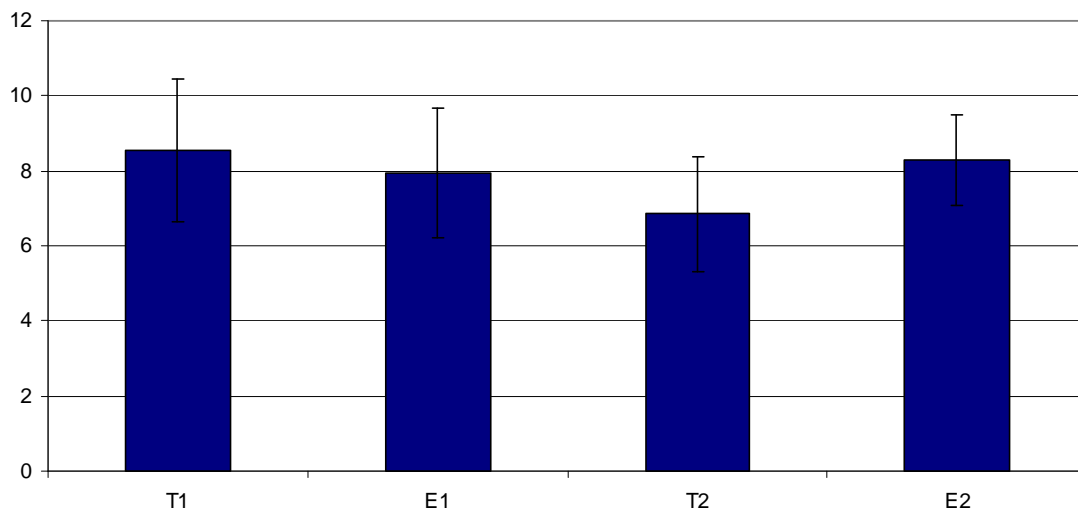


Figure 33 : Niveau de dommage à l'ADN évalué par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes pour les érythrocytes circulants des poissons maintenus en laboratoire (T1 et T2) ou exposés sur la Save (E1 relevé avant la crue ; E2 relevé après la crue).

La figure 34 illustre la fréquence de micronoyaux observée dans chacun des lots. Aucune différence significative n'est détectée.

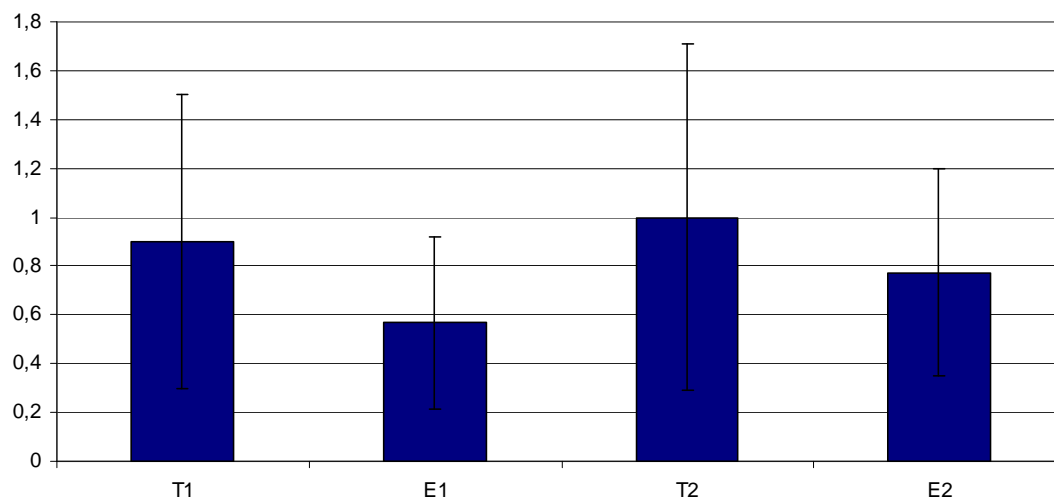


Figure 34 : Fréquence de micronoyaux (‰) mesurée dans les érythrocytes circulants des poissons maintenus en laboratoire (T1 et T2) ou exposés sur la Save (E1 relevé avant la crue ; E2 relevé après la crue).

4.4 Discussion

Au cours de cette expérimentation, les barbeaux ont été exposés sur le terrain à la crue de printemps à laquelle les carassins ont été exposés au laboratoire. De la génotoxicité avait été observée chez les carassins exposés, en revanche aucun effet génotoxique n'est constaté chez le barbeau.

Grisolia et Cordeiro (2000) ont mis en évidence la variabilité d'induction de MN entre différentes espèces de poissons. Le résultat observé peut donc refléter une différence de sensibilité intrinsèque de ces deux espèces. Par ailleurs, les barbeaux ont été prélevés sur le Touch, un cours d'eau voisin de la Save. En raison d'une occupation du sol semblable des deux bassins versants, les individus avaient vraisemblablement été soumis à une contamination chimique par herbicides avant leur capture. L'absence d'impact de la crue peut donc suggérer une adaptation, une acclimatation ou un potentiel d'acclimatation accru de la population échantillonnée lui permettant de supporter les conditions de stress chimique.

L'acclimatation implique l'ensemble des ajustements physiologiques, comportementaux et/ou biochimiques intervenants au niveau individuel et qui permettent à un organisme de faire face à un stress. Dans le cas d'un stress chimique, l'acclimatation peut concerner la mise en œuvre des systèmes de

détoxication. L'induction des mécanismes de détoxication de phase I ou II chez des poissons exposés aux herbicides est largement documentée (cf chapitre 2 de la partie I). On peut penser que ces mécanismes, ou que l'induction de protéines de résistance aux multixénobiotiques, présentent une meilleure efficacité chez les barbeaux fluviatiles prélevés dans le milieu que chez des carassins, a priori naïfs par rapport à une contamination par herbicides.

L'adaptation répond à une pression de sélection au fil des générations. Une sélection des génotypes plus résistants en terme de génotoxicité à la contamination a été suggérée chez le chevaine par Larno et al. (2001) à la suite de travaux lors desquels la prédominance de certains génotypes associés à une meilleure intégrité de l'ADN a été observée dans des zones contaminées. Le barbeau fluviatile est relativement mobile, notamment lors des migrations pré-reproductive (Baras et al., 1994). Cependant, des résultats de suivi télémétrique indiquent qu'ils conservent un même site de reproduction d'une année sur l'autre (Ovidio et al., 2007). Les auteurs suggèrent alors un isolement génétique potentiel entre populations. Ce mécanisme favoriserait la mise en place du phénomène d'adaptation. Cependant, les données expérimentales, sur ce modèle et dans ce contexte, sont encore trop rares pour conclure à ce sujet.

Les essais comètes effectués sur des carassins communs exposés à de l'eau prélevée dans la Save ont révélé le potentiel génotoxique de celle-ci. La comparaison de 3 conditions hydrologiques contrastées a mis en évidence une plus grande génotoxicité de l'eau de la Save prélevée lors d'une crue de printemps par rapport à une crue d'hiver ou un débit de base. Cette condition est la seule à induire une augmentation significative du taux de MN. Des expositions à des mélanges de 5 ou 7 herbicides, reconstituant respectivement la crue de printemps étudiée ou l'ensemble des pics de contamination observés sur la Save ces 2 dernières années ont confirmé, par l'essai comète, la génotoxicité des herbicides en mélange. En revanche, il n'a pas été observé d'induction de micronoyaux lors de ces expositions. Enfin, aucun impact génotoxique n'a été mesuré chez des barbeaux fluviatiles exposés, en cage, à une crue de printemps. La confrontation des résultats de ces différentes expérimentations met en évidence l'influence des conditions environnementales sur le potentiel génotoxique des mélanges d'herbicides.

Chapitre 3 : Dosage des herbicides dans les matrices biologiques

1. Introduction

La mise en évidence de l'impact génotoxique des épisodes de contamination associés aux crues a fait apparaître la nécessité de considérer ces événements dans le cadre de l'évaluation de la qualité chimique des cours d'eau. L'influence du contexte environnemental lors de ces événements a également été mise en évidence.

L'une des principales caractéristiques de l'eau de crue est la forte quantité de matière en suspension. Selon leur solubilité, les contaminants sont plus ou moins adsorbés sur les particules ou présents sous forme dissoute dans la phase aqueuse. On peut s'interroger sur l'influence de cette compartimentation sur la biodisponibilité des contaminants pour les organismes. La biodisponibilité des molécules conditionne leur transfert depuis le milieu vers les organismes. En mesurant la concentration des molécules dans les tissus, il serait donc possible d'intégrer la notion de biodisponibilité dans la caractérisation de la contamination à laquelle sont exposés les organismes aquatiques dans le contexte des crues.

De plus, la mesure de la présence des contaminants dans les organismes, et de leur répartition entre les organes, constitue une donnée à l'interface entre la qualité chimique et la qualité biologique du milieu. L'enjeu est alors d'améliorer la compréhension des liens entre la contamination du milieu, en particulier en période de crue, et les effets biologiques mesurés. L'étude de la répartition des contaminants dans les différents tissus permettrait d'explorer les processus de transfert et de décontamination, fournissant ainsi des données utiles pour tenter de prédire l'impact biologique à partir de données de contamination chimique. A ce titre, les poissons apparaissent comme des organismes de choix pour effectuer de telles mesures. Le couplage des données de génotoxicité présentées précédemment avec des données de contamination pourrait permettre d'associer les notions de qualités chimiques et biologiques.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de protocole d'extraction multi-résidus permettant de quantifier la concentration en contaminants agricoles (triazines, urées substituées, anilides) dans les tissus des poissons. C'est pourquoi nous avons cherché à valider une telle méthode mise au point au laboratoire. Pour cela, nous avons déterminé les valeurs de rendement et de reproductibilité d'une méthode d'extraction par ASE (Accelerated Solvent Extraction) à partir d'échantillons de filets et de foies de carassins enrichis par un mélange connu de contaminants à deux concentrations, $1\mu\text{g.g}^{-1}$ et $0,1\mu\text{g.g}^{-1}$.

2. Méthode d'extraction des contaminants organiques dans les matrices biologiques : état de l'art et choix de la méthode

2.1 Extraction

Dans la mise en œuvre d'analyses chimiques, la première étape consiste à extraire les molécules recherchées de la matrice échantillonnée. Plusieurs techniques existent pour extraire les pesticides des matrices solides. Les méthodes classiques telles que l'extraction par agitation, sonication ou par la méthode de Soxhlet sont longtemps restées les plus utilisées.

Le principe de base pour extraire les analytes de la matrice consiste à confronter l'échantillon avec un solvant pour lequel les analytes ont une affinité chimique. Ce sont les analytes présents dans le solvant qui sont quantifiés. Le broyage de la matrice augmente les surfaces d'échanges, et l'agitation facilite le transfert des extraits depuis la matrice vers le solvant. C'est cette méthode qui a été utilisée par Biaganti-Risbourg et Bastide (1995) pour extraire l'atrazine présente dans les foies de mulet. Les organes ont été broyés avec du sable de Fontainebleau dans un volume de méthanol. L'extrait a ensuite été filtré, évaporé puis repris dans de l'hexane pour analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC). De la même façon, la méthode développée par Kadenczki et al., (1992) pour extraire les résidus de pesticides dans les fruits et légumes à laquelle ont eu recours Tarja et al. (2003) pour doser la terbutryne et la terbuthylazine dans du muscle de truites consiste à homogénéiser l'échantillon dans un volume de Florisil avant la purification. Sondhia (2008) a procédé de cette même façon pour extraire le sulfosulfuron d'échantillons de *Catla catla*, un cyprinidé endémique du nord de l'Inde. Jacomini et al. (2003) ont

également eu recours à l'agitation mécanique pour extraire l'atrazine des tissus de bivalves. Selon ce protocole, des échantillons de tissus lyophilisés sont remis en solution avec de l'eau et de la soude, puis une extraction liquide-liquide est effectuée avec du dichlorométhane. La phase organique est concentrée après agitation mécanique et centrifugation. La sonication du mélange solvant-matrice permet de faciliter le transfert des analytes. C'est en fait une variante plus fine de l'agitation mécanique. Cette méthode a été utilisée par Hong et al. (2004) pour extraire 24 pesticides organochlorés dans des tissus de poissons.

L'extraction par la méthode de Soxhlet consiste à chauffer le solvant d'extraction dans un ballon, puis à le recondenser pour qu'il retombe dans le corps de l'extracteur. Il y est alors en contact avec la matrice et se charge des analytes. Un système de siphon ramène cycliquement le solvant chargé d'extraits dans le ballon où il sera à nouveau évaporé. Les extraits, dont la température d'ébullition doit être largement supérieure à celle du solvant, se concentrent dans le ballon au fil des cycles. Ce dispositif a été utilisé par Yim et al., (2005), Das et al., (2002) et Menone et al., (2000) pour déterminer la concentration en pesticides organochlorés dans des échantillons de poissons. En raison de la température des vapeurs, cette méthode ne peut en revanche pas être utilisée pour extraire des molécules thermolabiles. Muñoz et Rosés (2000) ont mené une étude comparative de rendements d'extraction de l'atrazine dans les tissus de bivalves en fonction de la méthode d'extraction. Les méthodes d'extraction par Soxhlet et trituration manuelle avec ou sans sonication ont été comparées. Les résultats révèlent la meilleure efficacité de l'agitation manuelle à condition qu'elle soit complétée par une sonication.

Les temps d'extraction ainsi que les volumes de solvants requis pour chacun de ces protocoles sont relativement importants (Duperyon et al., 1999). De nouvelles techniques émergent pour extraire les pesticides des matrices biologiques. Ces nouveaux protocoles font appel aux propriétés des fluides en conditions supercritiques ou aux micro-ondes et visent à optimiser l'extraction en diminuant les quantités de solvants utilisées, le temps d'extraction et en augmentant le rendement.

L'extraction en condition supercritique (SFE pour « Supercritical Fluid Extraction ») tire profit de la modification des caractéristiques des solvants en condition supercritique, c'est-à-dire comprimé au delà de sa pression critique. Les propriétés physiques du fluide, le plus souvent du CO₂, sont alors intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. De cette façon, le pouvoir de dissolution

d'un solvant est considérablement augmenté. Dans le cadre d'extraction en conditions supercritiques, le fluide perd son pouvoir de dissolution au moment de la récupération, et le produit extrait précipite. Cette technique est notamment utilisée pour extraire les pesticides d'échantillons alimentaires tels que la viande de bœuf (Juhler, 1998), volaille (Snyder et King, 1993), blé et maïs (Norman et Panton, 2001).

L'extraction assistée par micro-onde (MAE – Microwave Assisted Extraction) utilise l'énergie des micro-ondes pour extraire les analytes de la matrice. L'extraction ne dure alors que quelques secondes à quelques minutes. Les équipements sont bien moins chers que ceux requis pour mettre en œuvre une SFE. Cette méthode est largement utilisée pour extraire les pesticides des matrices organiques, telles que l'huile d'olive (Fuentes et al., 2008), les légumes (Singh et al., 2004).

L'extraction accélérée par solvant (A.S.E pour « Accelerated Solvent Extraction ») est une technique d'extraction récente, développée depuis 1995. Elle consiste à maintenir le solvant en contact avec la matrice sous haute pression, optimisant ainsi l'extraction. Les solvants peuvent être utilisés à haute température, la pression permettant de les maintenir à l'état liquide à des températures supérieures à leur point d'ébullition. Ces conditions ont pour conséquence de réduire la force des interactions entre la matrice et les composés à extraire. Les délais ainsi que les volumes de solvants sont donc considérablement réduits. Dans le cadre d'extraction de diflufenican dans le sol, Conte et al. (1997) font état d'une réduction par cinq des volumes de solvants utilisés et un temps d'extraction réduit par quatre par rapport aux méthodes classiques.

2.2 Purification

A la suite de l'extraction, la purification a pour but d'isoler les molécules recherchées des coextraits issus de la matrice et qui sont susceptibles de perturber l'analyse. Certaines précautions prises en amont de l'extraction permettent de faciliter ces étapes de purification. L'eau contenue dans les échantillons peut par exemple être éliminée en lyophilisant l'échantillon préalablement à l'extraction ou en le broyant dans l'Hydromatrix®. Cette terre de diatomée a en effet pour caractéristique de piéger l'eau. De plus cette étape permet d'augmenter la surface spécifique, ce qui facilite l'interaction entre l'échantillon et le solvant d'extraction.

Dans le cas des extraits issus d'échantillons de poissons, un des principaux objectifs des étapes de purification est de débarrasser l'échantillon des lipides coextraits. Plusieurs méthodes sont largement utilisées. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour « Size Exclusion Chromatography ») (Menone et al., 2000 ; Konwick et al., 2006), la chromatographie sur colonne avec gel de silice et alumine ou Florisil (Das et al., 2002, Yim et al., 2005; Padula et al., 2008) ou la répartition liquide-liquide (Manirakiza et al., 2001) sont des techniques largement utilisées. Le froid peut également être utilisé comme un outil pour débarrasser un échantillon des matières grasses qu'il contient. En effet, le froid fige les lipides, qui peuvent ainsi être ôtés de la solution par filtration. Cette étape n'altère pas le rendement de l'extraction puisque les contaminants ne sont pas présents dans la phase lipidique. En procédant à plusieurs filtrations, il est possible d'éliminer de façon satisfaisante les graisses d'un échantillon.

D'autres techniques peuvent être utilisées pour purifier au maximum les extraits. La partition liquide-liquide (Krause, 1985), la chromatographie par gel (Krynitsky et al., 1988 ; Balinova, 1998) sont également fréquemment utilisées. L'usage des techniques de dialyses (Strandberg et al., 1998) ou de chromatographie par immunoaffinité (Farjam et al., 1991) reste plus confidentiel pour ce type d'application. Le plus souvent les techniques ont été miniaturisées sur des colonnes faiblement chargées et prêtes à l'emploi, les extraits sont ainsi purifiés sur cartouche de Florisil (Volta et al., 2009 ; Tsuda et al., 1997) ou de cartouche C-18 (Darko et al., 2008 ; Sun et al., 2005).

Dans le cadre du protocole d'extraction multi-résidus testé au cours de cette étude, l'extraction a été réalisée par la méthode ASE « Accelerated Solvent Extraction » avec un mélange de solvant dichlorméthane/acétonitrile à une température ne dégradant pas les molécules à extraire . La purification s'est faite en deux temps. Dans un premier temps, les lipides ont été séparés des extraits par filtration après avoir été figés par le froid. Dans un second temps, les extraits concentrés ont été purifiés sur cartouche. Les phases hexaniques ont été purifiées sur cartouche de Florisil, tandis que les phases 'acétonitrile' ont été purifiées sur cartouche HLB plus. L'analyse chimique a été effectuée par GC-MS.

Le protocole utilisé est décrit dans le paragraphe suivant et est représenté dans la figure 35. Dans la mesure où il a été mis au point au sein du laboratoire, il a été nécessaire de le valider expérimentalement. A ce titre, les rendements d'extractions ont été mesurés pour chaque molécule dans le foie et le filet. La reproductibilité de la méthode a également été évaluée.

3. Evaluation d'un protocole d'extraction multi résidus par ASE

3.1 Introduction

Les rendements et la reproductibilité ont été évalués sur la base d'analyses de quatre échantillons de foies et de filets enrichis d'un mélange de 23 contaminants. Deux concentrations ont été testées $1\mu\text{g.g}^{-1}$ et $0,1\mu\text{g.g}^{-1}$.

3.2 Matériel et méthode

3.2.1 Consommables et matériel

Tout l'équipement utilisé au cours des extractions est en acier inoxydable et en verre afin d'éviter l'adsorption des analytes. L'acétonitrile utilisée est de qualité HPLC pour préparative. Le dichloromethane et l'hexane sont de qualité Pestipur. Tous ces solvants ainsi que le sulfate de sodium anhydre proviennent du fournisseur SDS-Carlo-Erba. L'ASE 200 et tout le matériel associé sont de marque DIONEX (Salt Lake City- Utah). La terre de Diatomées (Hydromatrix®) provenait de Varian, Palo Alto, Californie. Les cartouches de Florisil et HLB utilisées pour la purification des extraits proviennent de Waters Corporation (Milford, Massachusetts). Elles ont été chargées au moyen de seringues en verre de la marque S.G.E. (Scientific Glass Engineering Pty. Ltd, Melbourne, Australie). Le Mix 44 utilisé comme étalon provient du Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Allemagne) et est distribué en France par C.I.L. (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-la-Grande, 33220 France).

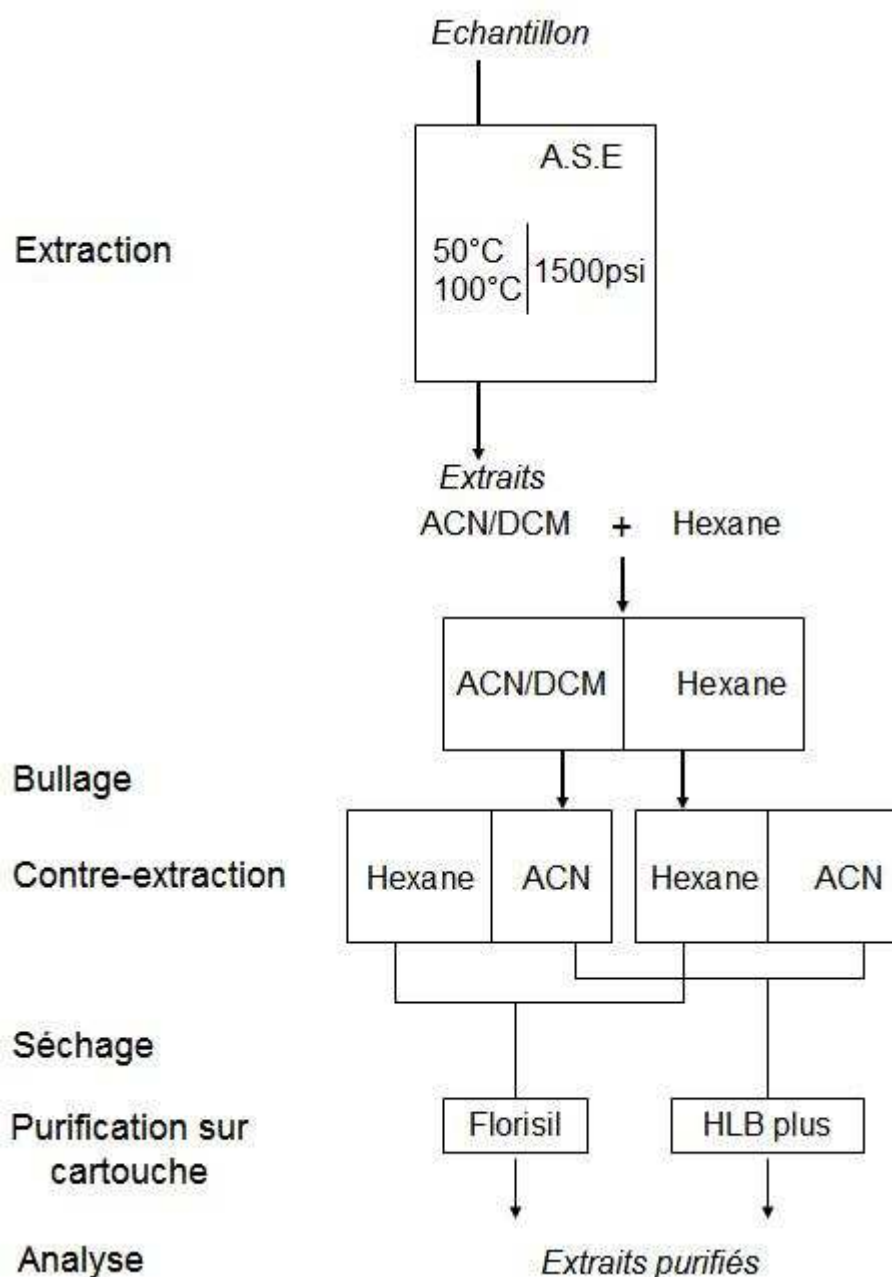


Figure 35 : Représentation schématique du protocole d'extraction

3.2.2 Préparation des échantillons

Les manipulations des poissons ont été effectuées conformément aux préconisations du comité national éthique du CNRS. Les échantillons de tissus ont été prélevés à froid, immédiatement après l'euthanasie des poissons par surdose de benzocaïne, puis conservés au congélateur à -80°C. Juste avant l'extraction, les échantillons ont été pesés congelés. Un minimum de 3g de tissus a été utilisé pour

l'analyse des échantillons de filets. Les foies ont quant à eux été « poolés » par 3 pour atteindre un poids total proche de 500 mg.

Les 23 contaminants pour lesquels les tissus ont été enrichis sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques des molécules spikées

	Solubilité	Log Kow	Masse moléculaire
Hexazinone	33 000	1,2	252,31
DEA	3200	1,5	187,63
Metoxuron	678	1,6	228,68
Simazine	6,2	2,1	201,66
Cyanazine	170	2,1	240,69
monolinuron	735	2,2	214,65
metobromuron	330	2,4	259,1
Metazachlor	450	2,5	277,75
Isoproturon	70,2	2,5	206,3
Chlorotoluron	74	2,5	212,68
sebutylazine		2,6	229,71
Alachlore	212	2,6	269,77
Atrazine	33	2,7	215,68
Linuron	64	3	249,1
cyproconazole	93	3,1	291,78
epoxiconazole	6,6	3,3	329,76
terbutylazine	8,5	3,4	229,71
Metolachlor	493	3,4	283,8
tebuconazole	36	3,7	307,82
fenpropimorph	4,3	4,1	303,48
Aclonifen	1,4	4,4	264,66
Trifluraline	0,3	4,8	335,28
Pendimethaline	0,3	5,2	281,31

Les échantillons ont ensuite été broyés en mélange avec de l'hydromatrix dans un rapport de poids échantillon : hydromatrix 1 :3. Les filets ont été broyés par un Waring-blender tandis qu'en raison du faible volume des échantillons, le broyage du foie a été effectué manuellement dans un mortier.

3.2.3 Extraction à l'ASE

Des cellules ASE Dionex de 22mL ou de 11mL ont été utilisées respectivement pour le traitement des échantillons de filets ou de foies. Le fond de la cellule est équipé de 3 filtres blanc en cellulose (Whatman ; Dionex Corporation) et

de 2g d'hydromatrix. La cellule est ensuite chargée de 10g du mélange d'échantillon et hydromatrix broyés, puis complétée par de l'hydromatrix. Deux filtres blancs en cellulose sont placés au sommet de la charge de la cellule.

L'extraction à l'ASE se fait au moyen d'un mélange de solvants acétonitrile (ACN) / dichlorométhane (DCM) (75/25 ; v/v). Le DCM et l'ACN sont deux solvants polaires aprotiques. Ils ne peuvent pas former de liaison hydrogène. Grâce à leur dipôle négatif, ils sont particulièrement indiqués pour solvater les molécules chargées positivement. Le mélange est injecté dans la cellule, maintenu pendant 5 minutes à 50°C et à une pression de 1500 psi. A l'issue des 5 min, 60% du volume de solvant est renouvelé. Cette séquence est reproduite 3 fois à cette température (Méthode 1), puis 3 fois à 100°C (Méthode 2). Les séquences d'extraction sont récapitulées dans le tableau 7. Le solvant chassé de la cellule est chargé des analytes extraits. Les volumes issus des extractions aux deux températures sont « poolés », puis placés dans un congélateur sécurisé Liebherr à -20°C pendant une nuit.

Tableau 7 : Paramètres d'extraction

Méthode	Solvants	Température (°C)	Temps de chauffage (min)	Cycles	Renouvellement (%)	Temps de purge (sec)
1	ACN /DCM (75/25)	50	5	3	60	180
2	ACN /DCM (75/25)	100	5	3	60	180

3.2.4 Echange de phase, bullage et contre-extraction

Avant de procéder à l'échange de phase, l'échantillon maintenu au congélateur est filtré. Cette étape permet de retirer les lipides figés par le froid. Cette opération devra être renouvelée autant de fois que nécessaire. Un volume d'hexane est ajouté au filtrat dans les proportions filtrat /hexane 80/60 (v/v). Le mélange est homogénéisé par agitation et ultra sons, puis replacé au congélateur pendant 24h. Après une nouvelle filtration, le mélange est soumis à un bullage à l'azote pour ôter le DCM. L'hexane étant moins dense que le mélange, il constitue la phase supérieure et le DCM est dans la phase inférieure. La canne de bullage est donc

placée à l'interface des deux phases. Après 20 min de bullage, on considère que le mélange d'extraction ne contient plus de DCM.

Les deux phase Hexane/ACN sont séparées au moyen d'une ampoule à décanter. Un volume d'ACN est ajouté à la phase hexane recueillie en proportion Hexane/ACN (60/40 ; v/v). Parallèlement, un volume d'hexane est ajouté à l'ACN dans les proportions ACN/Hexane (80/60 ; v/v). Après avoir été homogénéisées, stockées au congélateur, puis filtrées une nouvelle fois, les phases ACN et Hexane de chacun des mélanges sont « poolées ». Le « pool » des phases ACN d'une part et le pool des phases hexaniques d'autre part sont ensuite séchés sur sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'eau résiduelle. Les volumes sont alors réduits à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (type Büchi) à un volume de 2 à 2,5 mL avant purification.

3.2.5 Purification

Les phases ACN et Hexane sont purifiées selon des protocoles différents. L'objectif est d'éliminer au maximum les coextraits, afin de permettre une détection et une quantification optimale des analytes d'intérêt en chromatographie gazeuse.

La phase hexanique est purifiée par passage sur cartouche Sep-Pak Plus Florisil. L'extrait réduit à 2mL est passé sur la cartouche, puis élué par 3 solvants successifs à 0,5 mL.min⁻¹. Dans un premier temps, 20mL d'un mélange de solvants hexane/éther éthylique (94/6) sont passés sur la cartouche, suivi de 10 mL d'un mélange hexane/acétone (90/10). Les éluions de ces deux solvants sont recueillies dans un seul ballon. L'élution du troisième solvant, 20 mL de mélange C, hexane / acétone (50/50), est recueillie à part pour être analysée séparément en GC/MS. La phase ACN est purifiée sur des cartouches Oasis HLB Plus. Celles-ci doivent être préalablement conditionnées par le passage de 3 solvants (2 mL d'hexane, 4 mL de méthanol puis 2 mL d'ACN). L'échantillon est ensuite passé sur la cartouche puis élué avec 5ml d'ACN. Les deux extraits purifiés sont ensuite évaporés puis conditionnés en mini-vial pour passage en GC/MS.

3.2.6 Analyse GC-MS

L'analyse GC-MS a été réalisée au moyen d'un chromatographe THERMO Finnigan Trace 2000 (Bellefonte, Pensylvania) équipé d'une colonne Phenomenex Zebron 5MS 30m X 0,25mm et couplé à un spectromètre de masse DSQ. Les conditions de température sont récapitulées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Conditions d'analyse en GC-MS

Pente (°C/min)	Température atteinte (°C)	Temps d'attente (min)
	45°C (pour les phases hexane) 55°C (pour les phases acetonitrile)	0,5 min
35°C/min	180°C	
6°C/min	240°C	
	240°C	25 min

L'hélium est utilisé comme gaz éluant (pureté >99.999%) à un débit de 1 mL.min⁻¹. La température de l'injecteur était de 280°C, et les échantillons ont été injectés en mode « splitless ».

3.3 Résultats

A l'issue des protocoles d'extraction et d'analyse, nous avons cherché à comparer la quantité mesurée pour chacun des produits par rapport à la quantité apportée. La figure 36 présente les rendements d'extraction pour chaque molécule dans les deux tissus enrichis à 1 µg.g⁻¹. La barre d'erreur représente l'écart type standard relatif, et permet donc d'appréhender la reproductibilité de ce protocole d'analyse.

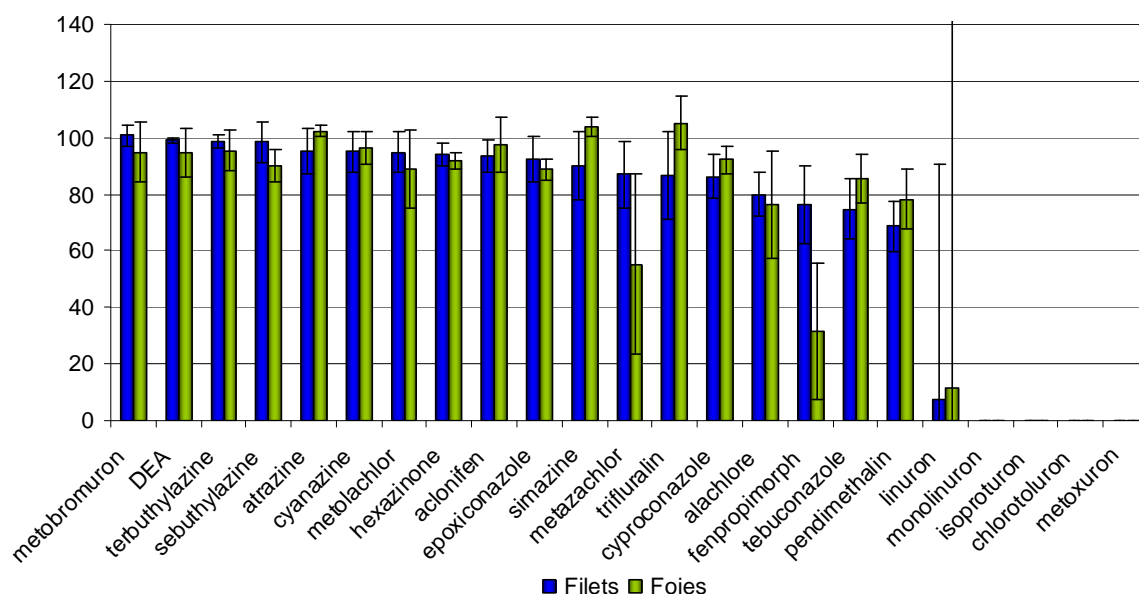


Figure 36 : Rendement et reproductibilité du protocole d'extraction à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour chacune des molécules testées.

Les rendements sont proches de 100% pour une majorité de molécules. Ils sont voisins de 80% pour l'alachlore, le tebuconazole et la pendimethaline. Le métazachlore et le fenpropimorph présentent des rendements d'extraction faibles dans le foie (55, 4 % et 31,6 % respectivement). Le rendement d'extraction de ces mêmes molécules est bien supérieur dans les filets (86,9% et 76,4% respectivement), ce qui semble indiquer une influence de la matrice biologique sur l'efficacité de l'extraction. En revanche, les rendements moyens pour le linuron sont faibles dans le filet et le foie, voisins de 10%, et les écarts-types sont très importants. Cette molécule ne semble pas pouvoir être analysée dans de bonnes conditions par ce protocole. Dans le cadre de cette expérimentation, le monolinuron, l'isoproturon, le chlorotoluron et le metoxuron n'ont pu être analysés.

Les rendements obtenus pour les échantillons enrichis à $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ sont présentés dans la figure 37.

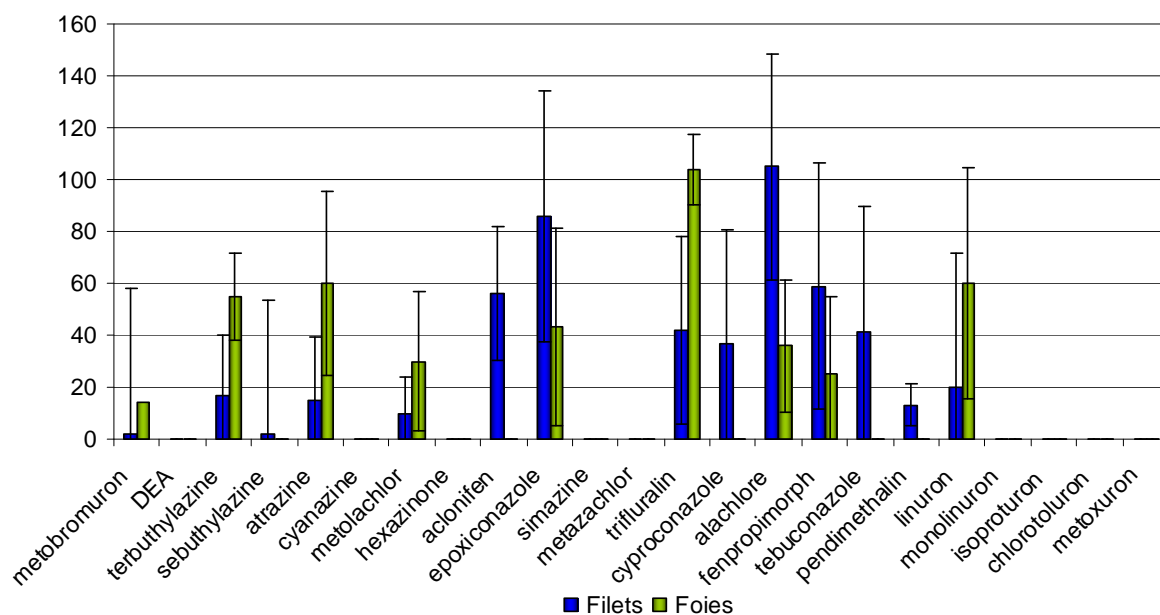


Figure 37 : Rendement et reproductibilité du protocole d'extraction à $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour chacune des molécules testées.

Les rendements d'extraction à cette concentration sont très différents de ceux obtenus pour la concentration dix fois supérieure. Dans cette situation, les rendements sont faibles. De nombreuses molécules ne sont pas détectées, ou ne le sont que dans un seul type d'organe. De plus, la très grande variabilité entre les organes, entre les molécules, et au sein même des lots démontre que la méthode n'est pas reproductible à cette concentration.

3.4 Discussion

Les mesures de rendement révèlent la validité de la méthode pour des concentrations en contaminants de $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ mais font apparaître ses limites pour l'analyse de charges plus fiables. En effet, la méthode n'est pas validée pour des concentrations en contaminants de $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$. A cette concentration, les analyses en GC-MS mettent en évidence une perte de produits au cours du protocole. Plusieurs molécules ne sont pas détectées à cette concentration. Certaines étapes de l'extraction, de la purification ou de l'analyse devraient donc encore être améliorées pour valider le test pour un usage en conditions environnementales.

Le solvant d'extraction constitué d'un mélange ACN/DCM avait été sélectionné dans l'objectif d'extraire les analytes tout en limitant l'entraînement des

lipides, principaux co-extraits dans le cadre de l'analyse des tissus de poissons. Ce mélange a donné de bons résultats pour des concentrations de contaminants de $1 \mu\text{g.g}^{-1}$. Un mélange constitué d'hexane et d'acétone favoriserait davantage l'extraction. L'acétone, polaire, permettrait d'extraire les molécules présentant un faible Log Kow, tandis que l'hexane entrainerait efficacement les molécules avec un fort Log Kow. Cependant des protéines et de nombreux lipides seraient extraits et pourraient perturber la suite de l'analyse.

Par ailleurs, parmi les molécules non détectées, une majorité étaient recueillies par le troisième solvant d'élution (hexane/acétone ; 50/50) lors de la purification de la phase hexanique sur cartouche de florisil au cours de l'expérimentation à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ (DEA, sebuthylazine, cynazine, hexazinone, simazine, pendimethaline). On peut donc suspecter qu'une partie des produits est perdue à cette étape de la purification. Cette perte n'a que peu affecté les rendements pour les échantillons plus concentrés. En effet, l'influence de la purification sur le résultat final est d'autant plus grande que la quantité de produits est faible. Afin de limiter l'impact de ces pertes et d'augmenter les rendements d'extraction à faible concentration, une stratégie pourrait donc consister à augmenter la quantité de chaque contaminant impliqué dans l'extraction. Pour cela, des prises d'échantillon plus grandes pourraient être envisagées. Cependant, dans le cas de l'étude de la charge en contaminant des foies de poissons, la taille de l'organe apparaît comme un facteur limitant. Dans ce cas, le volume du solvant d'élution, ou sa polarité, pourrait être augmenté afin d'entraîner le plus possible d'analytes.

Enfin, les urées substituées n'ont pu être quantifiées au cours de cette expérimentation. Ces molécules étant thermolabiles, on peut penser qu'elles ont été décomposées au cours de l'injection en GC-MS. Une injection froide en GC (injection 'on column') ou une analyse à froid en LC-MS permettrait de s'affranchir de la chaleur susceptible de dégrader certaines molécules.

Un protocole d'extraction par ASE a été évalué pour le dosage des pesticides dans les tissus de poissons. Pour des filets enrichis à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$, l'analyse en GC-MS révèle des rendements d'extraction supérieurs à 80% pour 15 molécules testées (13 pour les foies) et une bonne reproductibilité. Cependant, pour des échantillons enrichis à $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ les rendements et la reproductibilité ne sont pas satisfaisants. Le domaine de validité de ce protocole d'analyse doit donc être déterminé avant son utilisation, et des stratégies alternatives permettant de meilleurs rendements doivent être explorées.

Chapitre 4. Discussion générale et perspectives

En conséquence de l'utilisation des phytosanitaires, la contamination des écosystèmes aquatiques est généralisée. Lors des épisodes de crues, l'intensité de cette contamination est accrue. Or dans le contexte de surveillance actuel de eaux de surface, visant à informer de l'état de contamination à l'échelle nationale, ces événements ne sont pas considérés. Ce travail a été mené dans le but d'évaluer les impacts biologiques de la contamination par herbicides dans un contexte environnemental, en portant une attention particulière aux épisodes de crues.

1. Etude des événements courts de contamination

L'un des enjeux de ce travail a été d'étudier spécifiquement l'impact des épisodes de crues. Ces événements sont courts et complexes. Les concentrations en contaminants ainsi que les facteurs environnementaux varient fortement en quelques heures à quelques jours (Taghavi et al., 2010). Afin d'évaluer l'impact des herbicides dans ce contexte, il a été nécessaire d'avoir recours à des stratégies d'exposition adaptées et de s'assurer de la validité des outils utilisés pour mesurer les effets biologiques explorés.

1.1 Stratégie d'exposition

L'utilisation de données obtenues à partir d'organismes prélevés sur le milieu n'aurait pas permis d'isoler spécifiquement les effets des crues. En effet, les individus prélevés *in situ* renseignent sur la contamination telle qu'ils l'ont intégrée depuis qu'ils y sont soumis (Minissi et al., 1996; Bombail et al., 2001 ; Talapatra et Banerjee, 2007). Il n'aurait donc pas été possible de distinguer les effets associés aux épisodes de crues par rapport aux effets chroniques de la contamination. De la même façon, comparer des mesures issues de prélèvements effectués sur le terrain avant et après une crue ne garantissait pas de prendre en compte uniquement l'impact de celle-ci. En effet, le comportement des poissons au cours des crues est complexe. David et Closs (2002) ont mis en évidence une réorganisation spatiale des populations de *Galaxias argenteus* lors des épisodes de crue. Cette réorganisation dépend notamment de la possibilité pour les poissons de trouver un refuge permettant

d'éviter la dévalaison provoquée par les plus forts courants. En conséquence, des prélèvements sur un même site, avant et après une crue peuvent conduire à l'échantillonnage de populations différentes.

Afin d'exposer les poissons sur une période de temps choisie tout en intégrant au mieux le contexte environnemental, deux stratégies ont été sélectionnées visant à offrir un bon compromis entre la pertinence écologique et la maîtrise des paramètres d'exposition. L'exposition au laboratoire à de l'eau prélevée sur le terrain permet d'exposer les organismes aux mélanges chimiques réels tels qu'ils existent dans le milieu, mais offre un contrôle de tous les autres paramètres d'exposition (da Silva Souza et Fontanetti, 2006 ; Lemos et al., 2007). L'exposition au laboratoire à un mélange de contaminants a permis d'évaluer la contribution des herbicides à l'effet observé. En utilisant les méthodes d'encagement, les organismes sont exposés sur le terrain en conditions réelles, mais il est possible de contrôler la provenance des individus et la durée d'exposition (Oikari, 2006; Whitehead et al., 2004; Bony et al., 2008; Srut et al., 2010). Il a ainsi été possible de considérer les effets exclusifs de la contamination brève associée aux crues, distinctement de la contamination chronique, tout en intégrant la complexité du milieu.

1.2 Validation des outils

Afin d'évaluer l'impact des ces expositions courtes, il était nécessaire de s'assurer de la validité des méthodes mises en œuvre pour les explorer. L'essai comète permet de quantifier des dommages induits instantanément, en revanche la situation est différente pour le test micronoyaux. En effet, de part son principe, décrit dans le paragraphe 1.1, chapitre 3 de la partie I, un temps de latence est requis entre le début de l'exposition et l'induction d'effets mesurables. En 1995, Al-Sabti et Metcalfe ont effectué une revue de la littérature traitant de la mesure des effets clastogènes chez les poissons. Parmi les 53 expérimentations considérées, 39 portaient sur le test MN sur érythrocytes. Ils ont conclu que le délai d'induction requis pour détecter des MN dans les érythrocytes était généralement de 1 à 5 jours. Ce résultat est étayé par une revue plus récente (Udroiu, 2006) qui confirme que, sur la base de la littérature, le pic de MN est observé entre 1 et 5 jours avec une majorité d'espèces pour laquelle le délai est de 2 à 3 jours. Depuis 2006, Cavas et Konen ont détecté une induction significative de MN chez le carassins 4 jours après l'exposition

(Cavas et Konen, 2007), et de nombreuses autres études sur d'autres modèles biologiques sont en accord avec ce délai (Vanzella et al., 2007; de Campos Ventura, 2008; Hoshina et al., 2008; Yadav and Trivedi, 2009; Ali et al., 2009; Nwani et al., 2010; Kumar et al., 2010). Dans le contexte écologique de notre étude, la durée de 96h d'exposition a été retenue car elle coïncide avec la durée moyenne du pic de sur la Save. Des expositions préliminaires de notre modèle expérimental *C.carassius* ont été effectuées en utilisant un mutagène de référence, le cyclophosphamide monohydrate (5 mg.L⁻¹). Celles-ci ont confirmé la validité de cet essai pour ce temps d'exposition.

Par ailleurs, si le test comète est reconnu pour sa sensibilité, le test de MN est parfois décrit comme peu sensible (Carrasco et al., 1990). Dans la mesure où cette étude vise à explorer l'impact génotoxique d'une exposition courte à un mélange de molécules dont le potentiel génotoxique n'est pas clairement établi, il était nécessaire d'optimiser sa sensibilité pour le mettre en œuvre de façon satisfaisante dans notre contexte expérimental. Pour améliorer la sensibilité du test MN sur érythrocytes, la coloration a été optimisée. Le plus souvent, les érythrocytes sont colorés au Giemsa avant le comptage des MN. Le chapitre 1.3 de la partie II décrit comment cette méthode de coloration peut conduire au comptage de faux positifs, responsables d'un taux de base de MN important et variable, réduisant par conséquent la sensibilité du test. En utilisant une coloration par fluorochrome spécifique de l'ADN, l'acridine orange, il a été possible d'augmenter la fiabilité et la sensibilité du test. Dans ces conditions expérimentales, la sensibilité de ce test s'est révélée satisfaisante dans nos conditions d'étude.

La différence de sensibilité entre les test MN et comète, largement décrite dans la littérature, a également été mise en évidence au cours de cette étude. En effet, les résultats des essais comètes sur carassins indiquent un impact génotoxique des mélanges expérimentaux d'herbicides, tandis qu'aucune induction significative de MN n'est mesurée. Les différences entre les résultats obtenus pour chacun de ces tests de génotoxicité peuvent être examinées au regard des différents types de dégâts observés. Le test MN est basé sur la quantification d'anomalies survenant lors de la division cellulaire. Dans le cadre de cette étude, les deux tests ont été mis en œuvre sur les érythrocytes circulants. Chez les poissons, le site principal d'érythropoïèse est le rein céphalique. Seule une atteinte de ce site de division impliquerait une modification du taux de cellules micronuclées parmi les érythrocytes

circulants. A l'inverse un impact des contaminants sur les cellules circulantes est à même d'induire des dommages quantifiés par le test comète. Ainsi, l'essai comète révèle des dommages à l'ADN qui peuvent résulter d'un impact direct des herbicides sur le sang circulant. Le test MN renseigne quant à lui sur une contamination globale des organes internes, incluant le rein céphalique.

Au moyen de stratégies d'exposition adaptées et en validant l'optimisation d'un test de génotoxicité largement utilisé dans le cadre des études environnementales, il a été possible d'explorer les effets biologiques induits par des épisodes courts de contamination tout en préservant le réalisme des conditions d'exposition.

2. Influence du contexte environnemental

Le plus souvent l'impact biologique des composés chimiques est évalué en conditions contrôlées. Le contaminant est alors testé seul, sur un organisme modèle expérimental, et souvent à des doses élevées par rapports aux conditions réalistes. La présence du contaminant étant le seul paramètre différenciant entre les individus exposés et les individus témoins, les effets biologiques mesurés peuvent lui être attribués (Bolognesi et al., 2006 ; Shukla et al., 2010 ; Nwani et al., 2010 ; Kumar et al., 2010). C'est de cette façon que Cavas et Konen (2007) et Konen et Cavas (2008) ont respectivement mis en évidence la génotoxicité de deux herbicides, le glyphosate et la trifluraline. Cependant le potentiel toxique, et notamment génotoxique, d'un milieu n'est pas déterminé par la présence d'un seul contaminant mais par l'ensemble complexe des conditions d'expositions, incluant l'ensemble des contaminants et des facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques.

2.1 La complexité de la contamination

2.1.1 Le mélange de contaminants

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes attachés à évaluer la génotoxicité des herbicides détectés dans l'eau de la Save sous la forme des mélanges auxquels sont exposés les organismes aquatiques. Les mélanges réels

prélevés sur le site et deux mélanges expérimentaux mimant une crue identifiée ou une synthèse des crues rencontrées lors de la période d'étude ont été testés. Dans tous les cas, ces mélanges se sont révélés génotoxiques pour *C.carassius*, induisant des cassures de brins détectées par l'essai comète. La génotoxicité de chacun des composants des mélanges, considéré seul, n'est pas clairement établie par la littérature. Par ailleurs, les concentrations testées dans le cadre de ce travail, qui sont celles effectivement rencontrées dans le milieu, sont relativement faibles, de l'ordre du microgramme par litre. Bien que nous n'ayons pas testé l'effet de chacune des molécules dans nos conditions expérimentales, nous pouvons suspecter une influence du mélange sur les impacts observés. En effet, les interactions entre les molécules peuvent moduler l'impact biologique d'un mélange. Ces interactions peuvent intervenir à différents niveaux de la « chaîne d'action toxique » tels que l'absorption, la biotransformation, la distribution ou l'élimination des composés (Lydy et al., 2004)

Laetz et al. (2009) ont mis en évidence une synergie des effets de différents pesticides, organophosphorés et carbamates testés en mélange, quant à l'inhibition de l'activité AChE chez des salmonidés. Anderson et Lydy (2002) ont démontré que l'impact d'insecticides organophosphorés (chlorpyrifos, methyl parathion, et diazinon) était accru en présence d'atrazine. Un résultat comparable a été observé par Lydy et Linck (2003) chez un oligochète (*Eisenia fetida*). Leurs travaux mettent en évidence une augmentation plus qu'additive de la toxicité du chlorpyrifos en présence d'atrazine et de cyanazine. La présence de ces triazines multiplie le potentiel de toxicité aiguë de l'insecticide par 7,9 et 2,2 respectivement. Des analyses chimiques ont permis d'explorer les mécanismes de cette interaction. Celles-ci ont révélé que la présence des herbicides n'augmentait pas l'absorption du chlorpyrifos, mais augmentait sa biotransformation en métabolites plus toxiques. Au cours de la même étude, un autre herbicide de la famille des triazines, la simazine n'a pas induit de tels mécanismes. Chez les vertébrés aquatiques, amphibiens et poissons, les résultats sont nuancés (Wacksman et al., 2006). Si la présence d'atrazine modifie la toxicité du chlorpyrifos chez *Xenopus laevis*, aucune interaction n'a été observée chez *Lepomis macrochirus* ou *Rana clamitans*, tandis que les résultats divergent pour *P. promelas*. Ce constat illustre la complexité des processus impliqués.

Les modes d'actions des différents contaminants en mélange sont susceptibles d'avoir un impact sur leurs interactions potentielles (Lydy et al., 2004). Dans le cas où les molécules présentent le même type d'action toxique (ex : inhibition de l'activité AChE) via les mêmes processus (ex : fixation sur un même type de récepteur) on s'attend à ce que leurs effets soient additifs. A l'inverse, lorsque les effets toxiques sont strictement indépendants, chacun des composants du mélange induira un effet, sans qu'il soit modulé par la présence de l'autre. Cependant, de manière générale, l'action d'un mélange résulte de l'ensemble des interactions intervenant en dehors de ces deux cas extrêmes (Broderius et Kahl, 1985).

Il n'est pas concevable d'imaginer tester l'ensemble des mélanges auxquels les organismes aquatiques sont susceptibles d'être exposés. Dès lors, l'utilisation de modèles prédisant la toxicité de mélanges de molécules apparaît nécessaire. Des modèles basés sur des caractéristiques physico-chimiques telles que coefficient de répartition octanol :eau (K_{ow}) sont déjà utilisés. L'approche de « relation quantitative structure à activité » (QSAR), visant à utiliser les corrélations entre la structure chimique et l'activité biologique est la plus utilisée (Hansch et al. 1995, Comber et al. 2003). Cependant, ces modèles ont été développés pour traiter de mélanges homogènes par leur structure et/ou leurs mécanismes d'action. Leur validité dans un contexte environnemental doit encore être améliorée (Lydy et al., 2004).

2.1.2 La présence de métabolites

Dans le milieu, les molécules sont soumises à de nombreux processus de dégradation (cf paragraphe 1.1 de la partie I). Les organismes sont donc exposés non seulement aux molécules telles qu'elles sont appliquées, mais également aux métabolites qui sont issus de leur dégradation. En France en 2007, l'AMPA et le DEA, métabolites respectifs du glyphosate et de l'atrazine, faisaient partie des quatre molécules les plus quantifiées dans les eaux de surface. Cependant, lorsque la toxicité d'un contaminant, ou d'un mélange de contaminants, est évaluée en conditions expérimentales, la molécule est le plus souvent testée sous sa forme pure. Dans le cadre de notre étude, le DEA est le seul métabolite ayant été dosé et ayant été intégré aux mélanges expérimentaux.

La dégradation des molécules peut modifier leur toxicité. Ainsi, Osano et al. (2002) ont démontré que le potentiel génotoxique d'un des produits de dégradation du métolachlore, le 2-ethyl-6-methylaniline, était plus important que celui du métolachlore lui-même. En utilisant le test Microtox, Kross et al. (1992) ont mis en évidence une toxicité des métabolites de l'alachlore et du carbofuran supérieure ou égale à celle de leurs molécules mères. En revanche, lors de cette même étude, la toxicité du DEA est apparue plus faible que celle de l'atrazine. Toujours en utilisant le test Microtox, Bonnet et al. (2007) ont mis en évidence que les produits de transformation du diuron étaient plus toxiques que le diuron lui-même, tandis que l'AMPA apparaît moins toxique que le glyphosate. Ces résultats suggèrent un rôle non négligeable des métabolites quant aux effets observés sur les poissons exposés à l'eau prélevée dans le milieu.

2.2 Les facteurs environnementaux modulant l'impact de la contamination

2.2.1 Les facteurs abiotiques

Au-delà des contaminants eux-mêmes qui peuvent avoir un effet différent selon qu'ils sont seuls ou en mélange, sous leur forme d'origine ou de métabolites, l'ensemble des facteurs environnementaux peut conditionner l'effet d'une contamination. La confrontation des résultats mesurés sur les individus exposés à l'eau prélevée sur le terrain avec ceux mesurés sur les individus exposés aux mélanges expérimentaux nous a permis de mettre en évidence l'influence de ces facteurs. Ainsi, bien que l'un des mélanges expérimentaux testé soit constitué des 5 molécules détectées en plus forte concentration lors de la première crue du printemps 2009, les effets biologiques de ce mélange et de l'eau prélevée sur le terrain lors de la crue sont différents (chapitre 2.2 de la partie II). Des cassures de brins de l'ADN sont détectées dans les deux situations par l'essai comète, mais seule l'exposition à l'eau de la crue induit une augmentation significative de la fréquence de MN dans les érythrocytes circulants.

L'expérimentation décrite dans le paragraphe 2.3 de la partie I tend à écarter la contribution du glyphosate dans l'induction de MN lors de la crue de printemps. Sur la base de nos données, nous ne pouvons exclure le fait que d'autres contaminants non détectés aient pu jouer un rôle.

Une des différences entre l'eau prélevée sur le terrain et le mélange expérimental est la présence d'une quantité importante de matière en suspension. L'impact direct de celle-ci ne peut être retenu car les poissons exposés à la crue d'hiver n'ont pas présenté d'induction de MN. En revanche, l'interaction entre le mélange de contaminants et les particules peut avoir modulé la biodisponibilité et de fait, l'impact. Les contaminants présents dans le milieu peuvent être adsorbés ou fixés par liaisons covalentes sur des particules, ce qui influe sur leur biodisponibilité. Celle-ci conditionne en partie leur impact sur les organismes non-cibles. Les caractéristiques chimiques de l'eau (pH ou force ionique) n'ont qu'une influence réduite sur la biodisponibilité des molécules qui y sont présentes (Hamelink et al., 1994). Cette influence est principalement indirecte, agissant par le biais de modulations de la physiologie des organismes. En revanche, la compartimentation d'un contaminant entre les phases dissoute et particulaire joue un rôle important quant à la biodisponibilité (Knezovich et al., 1987). Cette répartition est le résultat de l'équilibre dynamique entre solubilité et sorption sur les particules. De la même façon qu'en milieu terrestre, cette répartition dépend principalement de la solubilité de la molécule, de l'affinité du contaminant pour les particules, et de la taille de celles-ci. Les contaminants en phase dissoute ou particulaire sont plus ou moins accessibles pour les organismes en fonction des caractéristiques de ceux-ci, notamment concernant les voies de transfert privilégiées (Calmano et al., 1993). Yang et al. (2006) décrivent une réduction de la biodisponibilité de deux insecticides, la bifenthrin et la permethrin vis-à-vis de *Daphnia magna* en présence de particules en suspension. A l'inverse, les travaux de Tsui et Chu (2003) démontrent que la présence de matière en suspension augmente la toxicité du glyphosate pour *Ceriodaphnia dubia*. La modulation de la toxicité de pesticides a également été mise en évidence par Sorensen et al. (2005). Cette étude démontre l'influence de la présence d'argile sur la génotoxicité des pesticides. La génotoxicité du dicamba étant augmentée tandis que celle de l'oxamyl était réduite. L'influence de la présence de matières en suspension sur la biodisponibilité des herbicides et sur la génotoxicité des mélanges pourrait être testée en conditions contrôlées.

Dans le cadre de ce travail, l'impact de la température est peu probable tant les variations étaient réduites entre le lot exposé à l'eau de la crue de printemps et celui exposé au mélange qui en mimait la contamination. Cependant, dans un contexte global, la température du milieu peut jouer un rôle non négligeable sur la

génotoxicité. Les poissons étant poïkilothermes, leur métabolisme, et la fréquence des mitoses, s'accélère lorsque la température augmente. Le potentiel d'induction de MN est donc d'autant plus important que la température est élevée (Udroiu, 2002). de Andrade et al. (2004b) ont également mis en évidence que les dommages à l'ADN induits par une exposition à un génotoxique de référence, le méthyl methanesulfonate (MMS) étaient plus importants à 37°C qu'à 25°C.

2.2.2 Les facteurs biotiques

Par ailleurs, les caractéristiques des organismes qui sont exposés aux contaminants conditionnent également la réponse biologique. Au cours de cette étude, le carassin commun (*C. carassius*) a été sélectionné en temps que modèle biologique pour les expérimentations en milieu contrôlé. Pour les expositions sur le terrain, le choix s'est porté sur le barbeau fluviatile (*B. barbus*), naturellement présent sur le site d'étude. Lors de la crue de printemps 2009, ces deux espèces ont été exposées à la même crue, soit sur le terrain, soit en laboratoire avec de l'eau prélevée. Alors que de la génotoxicité a été mise en évidence chez les carassins, aucun impact n'a été mis en évidence chez les barbeaux pourtant exposés à un flux de contaminants. De part leur site de prélèvement, on peut supposer que les individus ont été exposés à une contamination par herbicide préalablement à l'expérimentation. Ce résultat suggère une acclimatation ou une adaptation de ces individus à la contamination agricole. En comparant les résultats mesurés sur des *B. barbus* prélevés dans des zones contaminées ou non contaminées, il serait possible d'évaluer l'impact de l'historique d'exposition. La présence d'effets sélectifs liés à la contamination pourrait être appréhendée par des approches de génétique des populations. L'analyse de la distribution du polymorphisme des marqueurs entre des populations de poissons exposées à différents niveaux de contamination permettrait de mettre en évidence d'éventuels effets sélectifs (Larno et al., 2001).

Au-delà de l'exposition passée des individus ou des populations, le choix de l'espèce peut avoir un impact sur les résultats observés (Grisolia et Cordeiro, 2000). En ce qui concerne les espèces impliquées dans cette étude, la différence de résultat observé entre les barbeaux fluviatiles et les carassins pourrait être appréhendée en testant des *B. barbus* prélevés dans des cours d'eau dans lesquels la pression de contamination est faible, éliminant de ce fait les effets potentiels de mécanisme

d'adaptation de la population ou d'acclimatation de l'individu. Cette différence de réponse interspécifique fait ressortir l'importance du choix du modèle biologique quant aux conclusions qu'il est possible de tirer. Ainsi, l'absence d'impact génotoxique des épisodes de crue sur le *B. barbus* ne nous permet pas de conclure quant aux autres espèces. Dans une perspective écologique, les réponses d'autres espèces de poissons présents dans ce type de cours d'eau, tels que le chevesne (*Leuciscus cephalus*) et le goujon (*Gobio gobio*) pourraient être explorées. D'autres groupes biologiques tels que les amphibiens, pour lesquels le test MN est standardisé (ISO 21427), ou les diatomées pour lesquels un effet génotoxiques des herbicides a été mis en évidence (Debenest et al., 2008), pourraient être utilisés.

De plus, au sein même d'une espèce, des facteurs biologiques intrinsèques à chaque organisme peuvent influencer l'effet biologique. L'âge, le sexe et le statut nutritionnel de chaque individu peuvent conditionner la réponse que celui-ci exprime lorsqu'il est exposé à une contamination (Akcha et al., 2004). De nombreux poissons se reproduisent au printemps (Mann, 1996), période à laquelle les crues sont les plus chargées en contaminants. L'étude des impacts de la contamination sur les individus sensibles tels que les jeunes en développement ou les adultes reproducteurs pourrait apporter une plus grande pertinence écologique aux résultats.

Enfin, bien que les mesures effectuées ne révèlent pas d'effet délétère pour les barbeaux en terme de génotoxicité, on ne peut exclure un impact de ces conditions de contamination. En effet, si des mécanismes d'acclimatation sont mis en place pour lutter face à la contamination, l'énergie investie pour le maintien de l'homéostasie n'est plus disponible pour la reproduction. De la même façon, si la résistance des barbeaux à ce stress chimique est liée à une adaptation, basée sur la sélection des génotypes les plus résistants, la diversité génétique de la population est altérée. Ceci peut avoir des effets délétères à l'échelle des populations. Ainsi, un coût de la résistance à la contamination chimique a déjà été mis en évidence chez le poisson (Marchand et al., 2004 ; Xie et Klerks, 2004). A ce titre, l'utilisation d'une approche multimarqueurs, permettant d'appréhender d'autres effets potentiels serait justifiée.

3. Perspectives

Les biomarqueurs de génotoxicité utilisés dans le cadre de ce travail ont mis en évidence l'impact des contaminations associées aux crues chez le poisson. Néanmoins, la compréhension des mécanismes mis en jeu et leurs implications aux échelles biologiques supérieures reste encore à explorer. Pour cela, une approche « multibiomarqueurs » permettant d'appréhender un spectre plus large d'effets biologiques pourrait être utilisée.

D'une part, afin d'explorer les mécanismes de toxicité, des mesures biologiques aux échelles plus fines pourraient être effectuées. L'hypothèse d'une action génotoxique indirecte des herbicides, via un déséquilibre oxydant-réducteur pourrait être explorée. De nombreuses études ont mis en évidence la perturbation des mécanismes de défense antioxydant chez des poissons exposés à divers herbicides (Fatima et al., 2007 ; Farombi et al., 2008). La mesure des biomarqueurs associés (SOD, CAT) permettrait d'investiguer la mise en œuvre de tels processus dans notre contexte expérimental. Par ailleurs, Il a été montré que la vitamine E (α -Tocopherol) présentait un rôle protecteur vis-à-vis des effets du stress oxydatif, (Chandan et al., 1997). L'ajout de cette molécule dans l'alimentation a déjà été utilisée pour réduire le stress oxydant provoqué chez *O.niloticus* par des microcystines produites par des cyanobactéries (Prieto et al., 2008). En appliquant le même protocole avant une exposition aux mélanges d'herbicides, il serait possible d'évaluer la contribution du stress oxydant sur les effets mesurés.

Une approche en protéomique, visant à identifier les modifications d'expression de protéines induites par l'exposition aux contaminants, peut également être envisagée pour explorer les mécanismes de toxicité des phytosanitaires. Ces méthodes sont récentes, mais des résultats expérimentaux démontrent déjà l'impact des pesticides sur l'expression des protéines. Ainsi, il a été démontré que l'exposition à deux insecticides, le chlorpyrifos et le carbaryl, modifiait l'expression de protéines chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Vioque-Fernandez et al., 2009). Dondero et al., (2010) ont pu mettre en évidence des profils transcriptomiques et protéomiques différents chez des bivalves exposés à deux insecticides neonicotinoïdes (Imidacloprid et Thiacloprid). Ceci révèle d'ailleurs des effets biologiques différents provoqués par deux xénobiotiques dont le mode d'action est similaire sur les

organismes cibles. Chez le poisson, Biales et al. (2010) ont mis en évidence des différences d'expressions de 24 protéines induites par l'exposition de *P. promelas* à deux insecticides, perméthrin et terbuphos, seul ou en mélange. Certaines de ces protéines ont été identifiées comme étant impliquées dans la glycolyse, le maintien du cytosquelette et la gestion de l'hypoxie. Les auteurs ont cherché à déterminer des « signatures d'expression de protéines » associées à chaque exposition. Sur la base de ces signatures, il a été possible de distinguer les individus exposés à la perméthrin des témoins. Cette approche est prometteuse quant à l'exploration des mécanismes impliqués dans la toxicité et pourrait permettre d'évaluer finement l'influence des mélanges sur les effets biologiques.

D'autre part l'utilisation de biomarqueurs associés plus directement à la fitness, tels que la survie ou la fécondité, pourrait permettre d'apprécier les conséquences de tels événements de contamination à l'échelle des populations. Dans le cadre d'étude sur le terrain, il est souvent délicat de mesurer de tels paramètres. De plus, une difficulté supplémentaire réside dans le fait d'attribuer des effets observés à une cause (contamination) identifiée. Dans le cas de l'étude des effets de la contamination associée aux crues, il serait par ailleurs nécessaire de pouvoir discriminer l'effet des événements ponctuels tels que les crues par rapport à la contamination chronique. L'utilisation de microcosmes pourrait donc être préférée. Diekmann et al. (2004) ont mené des expérimentations en milieu contrôlé sur toute la durée du cycle de vie de poissons-zèbres. Ils ont ainsi pu mettre en évidence l'impact d'un génotoxique de référence, le 4-nitroquinoline-1-oxide, sur la production d'œufs. Un tel protocole, bien que très lourd à mettre en œuvre, permettrait d'évaluer les impacts des épisodes courts de contamination, survenant notamment lors des phases clés du cycle de vie, telles que la reproduction ou le développement des larves. Dans ce cadre d'expérimentations longues en conditions contrôlées, il serait également possible d'exposer les individus à une succession d'expositions courtes. En effet, les crues ne sont pas des événements isolés, mais qui se succèdent. Comme indiqué lors de la présentation du site d'étude, la ville d'Auch a été concernée par une moyenne de 5 orages par mois entre mai et août entre 1984 et 1993 (Colin, 2000 ; Chambre d'Agriculture du Gers, 1996). Diamond et al. (2005), ont cherché à évaluer l'influence chez *Daphnia magna* et *P. promelas* de séquences d'expositions courtes à divers contaminants (cuivre, zinc et ammoniac). Ils ont

démontré que les effets biologiques résultaient de la combinaison de la fréquence, de la magnitude et de la durée des expositions. Parallèlement à la mesure des impacts, l'étude des temps de résilience permettrait d'appréhender de façon pertinente les effets des successions de crues telles qu'elles surviennent au printemps.

Les résultats de ces travaux constituent par ailleurs une avancée dans la perspective d'une appréhension intégrée de la qualité du milieu. En effet, la validation d'un protocole d'analyse multirésidus d'herbicides dans les tissus de poissons permettrait de caractériser la contamination telle qu'elle est perçue par les organismes, intégrée dans le temps et en lien avec la biodisponibilité. Actuellement, le suivi de la qualité chimique de l'eau implique des prélèvements d'échantillons. Ceux-ci peuvent être manuels, requérant le déplacement de personnel sur le site. Les instants d'échantillonnages ne sont alors pas toujours révélateurs de la contamination lors de la crue. L'utilisation de préleveurs automatiques permet de prélever des échantillons à distance au moment voulu. Cependant ce matériel est coûteux dès qu'il bénéficie d'options comme un asservissement au débit ou une thermostatisation, et ne peut donc être largement déployé. Dans les deux cas, les prélèvements sont ponctuels, et ne permettent pas de considérer le flux de contaminants et sa variation temporelle. Le dosage des contaminants dans les tissus pourrait en revanche être comparé avec les capteurs passifs (type POCIS), dont le fonctionnement est basé sur l'intégration de la contamination dans le temps. La comparaison des données issues de capteurs passifs ou des organismes permettrait de faire apparaître l'influence des paramètres biologiques tels que la détoxification ou les voies de transferts quant à la contamination des poissons.

Enfin, par l'intermédiaire d'outils de modélisation, les données de dosage dans l'eau pourraient être mises en relation avec des mesures dans les tissus, puis avec les effets. L'objectif serait alors de prédire les altérations biologiques dans le milieu sur la base de mesures de la qualité chimique. Néanmoins, avant de parvenir à un tel résultat, de nombreuses étapes doivent être franchies, tels que la compréhension des voies de contamination et de détoxification des organismes, ainsi que la prédiction des impacts à partir de la caractérisation de la contamination.

Références

Ah-Peng, C., Rausch de Traubenberg, C. 2004. Bryophytes aquatiques bioaccumulateurs de polluants et indicateurs écophysiologiques de stress: synthèse bibliographique. *Cryptogamie, Bryologie* 25(3), 205-248.

Akcha, F., Leday, G., Pfohl-Leszkowicz, A. 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat. Res.* 552 (1-2), 197-207.

Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S. 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 650-656.

Al-Sabti, K. 1986. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios* 47, 147–154.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121–135.

Alvarez, M.D., Fuiman, L.A. 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat. Toxicol.* 74 (3) 229-241.

Anderson, S., Sadinski, W., Shugart, L., Brussard, P., Depledge, M., Ford, T., Hose, J., Stegeman, J., Suk, W., Wirgin, I., Wogan, G. 1994. Genetic and molecular toxicology: a research framework, *Environ. Health Persp.* 102 (S12), 3-8.

Anderson, S.L., Wild, G.C. 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Persp.* 102 (S12), 9-12.

Anderson, T.D., Lydy, M.J. 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (7), 1507-1514.

Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C. 2004. A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (10), 2343-2355.

Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14(4): 257–297.

Arufe, M.I., Arellano, J., Moreno, M.J., Sarasquete, C. 2004. Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotox. Environ. Saf.* 59(2), 209-16.

- Ateeq, B., Farah, M.A., Niamat Ali, M., Ahmad, W. 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutat. Res.* 518 (2)135-144.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ahmad, W. 2006. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sci.* 78(9), 977-86.
- Aubertot, J.-N., Barbier, J.-M., Carpentier, A., Gril, J.-J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Voltz, M., Savini, S. 2005. Pesticides, agriculture et environnement Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Paris, INRA CEMAGREF, 64.
- Bach, M., Huber, A., Frede, H.G. 2001. Modeling pesticide losses from diffuse sources in Germany. *Water Sci. Technol.* 44 (7), 189-196.
- Bain, M.B., Boltz, S.E. 1992. Effect of Aquatic Plant Control on the Microdistribution and Population Characteristics of Largemouth Bass. *T. Am. Fish Soc.* 121, 94-103.
- Baker, J. L. 1992. Effect of tillage and crop residue on field losses of soil-applied pesticides. P 175-187. In I. L. Schnoor (ed.) *Fate of pesticides and chemicals in environment*. John Wiley & sons, New York.
- Balinova, A. 1998. Multiresidue determination of pesticides in plants by highperformance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up. *J. Chromatogr. A.* 823, 1–16.
- Baras, E., Lambert, H., Philippart, J.-C. 1994. A comprehensive assessment of the failure of *Barbus barbus* spawning migrations through a fish pass in the canalized River Meuse (Belgium). *Aquat. Living Resour.* 7, 181-189.
- Bard, S.M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48 (4), 357-389.
- Barriuso, E., Benoit, P., Dignac, M.F. 2004. Le devenir des pesticides dans l'environnement. *Comptes-rendus de l'Académie de l'Agriculture de France* 90, 15-22.
- Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B. 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72 (6), 1734-1739.
- Beek, B., Böhling, S., Franke, C., Studinger, G. 1992. Bioaccumulation. Assessment concept and strategies for use in the implementation of chemicals legislation. Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt-UBA).
- Beek, B., Böhling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Jöhncke, U., Studinger, G. 2000. The Assessment of Bioaccumulation. *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J Bioaccumulation (ed. by B. Beek).

- Behera, B.C., Bhunya, S.P. 1990. Genotoxic effect of isoproturon (herbicide) as revealed by three mammalian *in vivo* mutagenic bioassays. *Ind. J. Exp. Biol.* 28, 862-867.
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.* 489 (2-3), 97-122.
- Berry, D.F., Boyd, S.A., 1985. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1132–1133.
- Bertin, G., Schiavon, M. 1989. Les résidus non extractibles de produits phytosanitaires dans les sols. *Agronomie* 9, 1-8.
- Bervoets, L., Meregalli, G., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R. 2004. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(2), 443-454.
- Biagianti-Risbourg S., Bastide, J. 1995. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. *Aquat. Toxicol.* 31 (3), 217-229.
- Biales, A.D., Bencic, D.C., Flick, R.L., Blocksom, K.A., Lazorchak, J.M., Lattier, D.L. In press. Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture. *Aquat. Toxicol.* In press.
- Birmelin, C., Mitchelmore, C.L., Goldfarb, P.S., Livingstone, D.R. 1998. Characterisation of biotransformation enzyme activities and DNA integrity in isolated cells of the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Phys. A.* 120 (1), 51-56.
- Black, J.J., Baumann, P.C. 1991. Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environ. Health Persp.* 90, 27-33.
- Bleuel, C., Wesenberg, D., Sutter, K., Miersch, J., Braha, B., Barlocher, F., Krauss, G.-J. 2005. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a biomonitor for heavy metals. 3. Cd²⁺ accumulation capacities and biochemical stress response of two *Fontinalis* species. *Sci. Total Environ.* 345, 13-21.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat. Toxicol.* 78, 93–98.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J. 2001. Application of the comet assay and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44, 383–392.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using

- two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. Environ Toxicol. 22 (1), 78-91.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., Devaux, A. 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. Aquat. Toxicol. 89, 197–203.
- Bretau, S., Toutant, J.P., Saglio, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). Ecotox. Environ. Safe. 47(2), 117-124.
- Bringolf, R.B., Belden, J.B., Summerfelt, R.C. 2004. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. Environ. Toxicol. Chem. 23(4), 1019-1025.
- Broderius, S., Kahl, M. 1985. Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. Aquat. Toxicol. 6, 307-322.
- Brüschweiler, B.J., Fent, K., Wurgler, F.E. 1996. Inhibition of cytochrome p4501a by organotins in fish hepatoma cells plhc-1. Environ. Toxicol. Chem. 15 (5), 728–735.
- Burton Jr., G.A., Greenberg, M.S, Rowland, C.D., Irvine, C.A., Lavoie, D.R, Brooker, J.A., Moore, L., Raymer, D.F.N., McWilliam, R.A. 2005. In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. Environ. Pollut. 134, 133–144.
- Butchiram, M.S., Tilak, K.S., Raju, P.W. 2009. Studies on histopathological changes in the gill, liver and kidney of *Channa punctatus* (Bloch) exposed to Alachlor. J. Environ. Biol. 30, 303-306.
- Cachot, J., Cherel, Y., Galgani, F., Vincent, F. 2000. Evidence of p53 mutation in an early stage of liver cancer in European flounder, *Platichthys flesus* (L.) Mutat. Res. 464 (2), 279-287.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. 1997. Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. Environ. Health Persp. 105 (10), 1034-1039.
- Cajaraville, M. P., Hauser, L., Carvalho, G., Hylland, K., Olabarrieta, I., Lawrence, A. J., Lowe, D., Goksoyr, A. 2003. Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. In: Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), pp. 14-82. Blackwell Sciences.
- Calderbank, A. 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. Rev. Environ. Contam. T. 108, 71–103.
- Calmano, W., Hong, J., Forstner, U. 1993. Binding and mobilisation of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. Water Sci Technol. 28 (8-9), 223-235.

- Cameron, P., Berg, J. 1992 Morphological and chromosomal aberrations during embryonic development in dab *Limanda limanda*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91, 163–169.
- Canty M.N., Hutchinson, T.H., Brown, R.J., Jones, M.B., Jha A.N. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). Aquat. Toxicol. 94 (1), 68-76.
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., Di Ilio, C. 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. Aquat. Toxicol. 90 (1), 48-57.
- Carrasco, K., Tilbury, K.L., Mayers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as in-situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish Aquat. Sci. 47, 2133-2136.
- Carrera, G., Fernandez, P., Vilanova, T.M., Grimalt, J. 2001. Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas. Atm Environ. 35, 245-254.
- Castano, A., Carbonell, G., Carballo, M., Fernandez, C., Boleas, S., Tarazona, J.V. 1998. Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotox. Environ. Safe. 41 (1), 29-35.
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., , Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., Clasen, B. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. Pestic. Biochem. Phys. 92 (3), 133-137.
- Cavalcante, D.G.S.M. 2008. Genotoxic effects of Roundup (R) on the fish *Prochilodus lineatus*. Mutat. Res. 655 (1-2), 41-46.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. Mutat. Res. 538, 81–91.
- Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquat. Toxicol. 74, 264–271
- Cavas, T., Konen S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis. 1–6.
- Cenci, R.M. 2000. The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages. J. Limnol. 60(S1), 53-61.
- Ceron, J.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Gutierrez-Panizo C., Andreu-Moliner E. 1996. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of european eel (*Anguilla anguilla*). Ecotox. Environ. Safe. 35 (3), 222–225.

Cericato L., Neto, J.G., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., da Rosa, J.G., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcello, L.J. 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 148 (3), 281-286.

Chambre d'agriculture du Gers, 1996. Diagnostic de la vulnérabilité globale du département du Gers. Etude préalable à la rédaction des programmes d'action dans le cadre de la directive « Nitrate » (Directive n°91/676/CEE). Auch, 86pp.

Chandan K.S. Atalay, M., Ågren, J., Laaksonen, D.E., Roy, S., Hänninen, O. 1997. Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. *J Appl Physiol* 83:189-195.

Chang, L.W., Toth, G.P., Gordon, D.A., Graham, D.W., Meier J.R., Knapp, C.W., Denoyelles F.J., Campbell, S., Lattier, D.L. 2005. Responses of molecular indicators of exposure in mesocosms: Common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicides alachlor and atrazine. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 190-197.

Chauhan, L.K., Saxena, P.N., Gupta, S.K., 2001. Evaluation of cytogenetic effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium sativum*. *Biomed Environ Sci.* 14, 214-9.

Cierieszko, A., Wolfe, T.D., Dabrowski, K. 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquat.Toxicol.* 73 (2), 128-138.

Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of Select Herbicides in *Rana catesbeiana* Tadpoles Using the Alkaline Single-Cell Gel DNA Electrophoresis (Comet) Assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 277- 288.

Colin, F, 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires Cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France). Thèse de l'ENGREF, 255 p.

Comber, M. H., J. D. Walker, C. Watts, Hermens, J. 2003. Quantitative structure-activity relationships for predicting potential ecological hazard of organic chemicals for use in regulatory risk assessments. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1822-1828.

Conte, E., Milani, R., Morali, G., Abballe, F. 1997. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. *J. Chromatogr. A.* 765 (1), 121-125.

Cook, P.R., Brazell, I.A. 1975. Supercoils in human DNA, *J Cell Science* 19, 261–275.

Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different

contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 45 (2), 106-121.

Costa, P.M., Caeiro, S., Diniz, M.S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.A, Costa, M.H. 2009. Biochemical endpoints on juvenile *Solea senegalensis* exposed to estuarine sediments: the effect of contaminant mixtures on metallothionein and CYP1A induction. *Ecotoxicology.* 18 (8), 988-1000.

Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Santos Miron, D.d., Spanevello, R., Silveira, A., Goncalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L. 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere.* 67, 2305-2311.

Crowe, T.P., Smith, E.L., Donkin, P., Barnaby, D.L., Rowland, S.J. 2004. Measurements of sub-lethal effects on individual organisms indicate community level impacts of pollution. *J. Appl. Ecol.* 41, 114–123.

da Fonseca M.B., Glusczak, L., Moraes, B.S., de Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella R., Gonçalves, F.F., Loro, V.L. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotox. Environ. Safe.* 69 (3), 416-420.

Darko, G., Akoto, O., Oppong, C. 2008. Persistent organochlorine pesticide residues in fish, sediments and water from Lake Bosomtwi, Ghana. *Chemosphere.* 72 (1), 21-24.

Das, B., Khan, Y.S.A., Das, P., Shaheen, S.M. 2002. Organochlorine pesticide residues in catfish, *Tachysurus thalassinus* (Ruppell, 1835), from the South Patches of the Bay of Bengal. *Environ. Pollut.* 20 (2), 255-259.

da Silva Souza, T., Fontanetti, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mut Res.* 605, 87-93.

David, B.O., Closs, G.P. 2002. Behavior of a stream-dwelling fish before, during, and after high-discharge events. *T. Am. Fish Soc.* 131 (4), 762-771.

Davies, R.P., Dobbs, A.J. 1984. The prediction of bioconcentration in fish. *Water Res.* 18 (10), 1253-1262.

de Andrade, V.M., da Silva, J., da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., de Freitas, T.R.O. 2004a. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two Southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 44 (5), 459-468.

de Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J. 2004b. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.* 560, 57–67.

- de Bravo, S.M.I., Medina, J., Marcano, S., Finol, H.J., Boada-Sucre, A. 2005. Effects of herbicide on the kidneys of two Venezuelan cultured fish: *Caquetaia kraussii* and *Colossoma macropomum* (Pisces: Ciclidae and Characeae). *Rev. Biol. Trop.* 53 5(1), 55-60.
- De Coen, W. M., Janssen, C. R. 2003. The missing biomarkers link: relationships between effects on the cellular energy allocation, biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1632-1641.
- Debenest, T. 2007. Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Thèse de l'Université de Bordeaux 1. 268 pp.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E. 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquat. Toxicol.* 88, 88–94.
- de Campos Ventura, B., de Angelis, D.d.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Phys.* 90 (1), 42-51.
- Deletic, A.B., Maksimovic, C.T. 1998. Evaluation of water quality factors in storm runoff from paved areas. *J. Environ.-ASCE.* 9, 869-879.
- Depledge, M.H. 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations, *Environ. Health Persp.* 102 (S12), 101-104.
- Depledge, M.H. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res.* 399 (1), 109-122
- den Besten, P.J. 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Mar. Environ. Res.* 46 (1-5), 253-256.
- Devault, D.A., Merlina, G., Lim, P., Probst, J-L., Pinelli, E. 2007. Multi-residues analysis of pre-emergence herbicides in fluvial sediments: application to the mid-Garonne River. *J. Environ. Monit.* 9, 1009-1017.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G. 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501a induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar. Environ. Res.* 46 (1-5), 257-262.
- Diamond, J., Bowersox, M., Latimer, H., Barbour, C., Bearn, J., Butcher, J. 2005. Effects of Pulsed Contaminant Exposures on Early Life Stages of the Fathead Minnow. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 511–519.
- Diekmann, B., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in

zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat. Toxicol.* 68, 27–37.

Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., Ciereszko, A. 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*. 64 (8), 1809-1822.

Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*. 17, 495-507.

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E., 1991. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 317–324.

Dizdaroglu, M. 1993. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I. (Eds.), *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 19–39.

Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F., Viarengo, A. 2010. Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Sci. Total. Environ.* 408 (18), 3775-3786.

Dunier, M., 1996. Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Ital. J. Zool.*, 63(4), 303-309.

Duperyon, S., Dudermel, P.M., Couturier, D., Guarini, P., Delatre, J.M. 1999. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soils: A Comparison Between Focused Microwave Assisted Extraction, Supercritical Fluid Extraction, Subcritical Solvent Extraction, Sonication and Soxhlet Techniques. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 73, 191.

Du Pont (Du Pont Canada, Inc.) 1984. Laboratory studies of phenyl-14C(u) linuron bioconcentration in bluegill sunfish. HLR no. 575-84, MR no. 7350-001. Du Pont Canada Inc., Mississauga, ON.

du Preez, H.H., van Vuren, J.H.J. 1992. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.101* (3), 651-655.

Dutta, H.M., Arends, D.A. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91 (3), 157-162.

Eastman, A., Barry, M.A. 1992. The Origins of DNA Breaks: A Consequence of DNA Damage, DNA Repair, or Apoptosis? *Cancer Invest.* 10 (3), 229-240.

Ellegren H, Lindgren G, Primmer CR, Møller AP. 1997. Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature*. 389, 593–596.

- El-Shebly, A.A., El-kady, M.A.H. 2008. Effects of glyphosate herbicide on serum Growth Hormone (GH) levels and muscle protein content in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.). Res. J. Fish. Hydrobiol. 3(2): 84-88.
- Enjalbert, H. 1960. Les pays aquitains, Le modelé et les sols. Bordeaux, Bière.
- Epstein, S.S., Legator, M.S. 1971. The Mutagenicity of Pesticides. MIT Press, Cambridge, MA, 9-19.
- Eufemia, N. A., Collier, T. K, Stein, J.E., Watson, D.E., DiGiulio, R.T. 1997. Biochemical responses to sediment-associated contaminants in brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*) from the Niagara River ecosystem. Ecotoxicology. 6, 13-34.
- Farjam, A., Vreuls, J.J., Cuppen, W.J.G.M., Brinkman, U.A.T. Jong, G.J. 1991. Direct introduction of large-volume urine samples into an on-line immunoaffinity sample pretreatment-capillary gas chromatography system. Anal. Chem. 63, 2481–2487.
- Farombi, E.O., Ajimoko, Y.R., Adelowo, O.A. 2008. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water african catfish, (*Clarias gariepinus*). Int. J. Environ. Res. Public Health 5, 423-427.
- Fatima M., Mandiki S.N.M., Douxfils, J., Silvestre F., Coppe P., Kestemon, P. 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune–endocrine interactions in goldfish: Immune and antioxidant effects. Aquat. Toxicol. 81 (2), 159-167.
- Fenelon, J.M., Moore, R.C. 1998. Transport of agrichemicals to ground and surface water in a small central Indiana watershed. J. Environ. Qual. 27,884–894.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E. 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. Pestic. Biochem. Phys. 72 (1), 55-63.
- Forbes, V.E., Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? Environ. Tox. Chem. 18 (7), 1544-1556.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 25 (1), 272-280.
- Fortin, M-G., Couillard, C.M., Pellerin, J., Lebeuf, M. 2008. Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. Mar. Environ. Res. 65 (2), 158-170.
- Frank, R., Sirons, G.J. 1979. Atrazine: Its use in corn production and its loss to stream waters in Southern Ontario, 1975–1977. Science of The Total Environ. 12 (3), 223-239.
- Frank, R., Braun, H.E., Holdrinet, M.V., Sirons, G.J., Ripley, B.D. 1982. Agriculture and water quality in the Canadian great-lakes basin. 5 Pesticides use in 11

agricultural watersheds and presence in stream water, 1975-1977. J. Environ. Qual. 11 (3), 497-505.

Fuentes, E., Báez, M.E., Quiñones, A. 2008. Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. J. Chromatogr. A. 1207 (1-2), 38-45.

Fulton, M.H., Key, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20 (1), 37-45.

Garmouma, M., Blanchard, M., Chesterikoff, A., Ansart, P., Chevreuil, M. 1997. Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin : Mèlarchez (France). Wat. Res. 31 (6), 1489-1503.

Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder R., Dunkelberg, H. 1997. *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. Arch. Toxicol. 71, 193-197.

Gedik, C.M., Ewen, S.W.B., Collins, A.R. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, Int. J Radiat. Biol. 62, 313-320.

Gevao, B., Semple, K. T., Jones, K.C. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. Environ. Pollut. 108 (1), 3-14.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., da Fonseca, M.B., Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotox. Environ. Safe. 65 (2), 237-241.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. 146 (4), 519-524.

Gluth, G., Freitag, D., Hanke, W., Korte, F. 1985. Accumulation of pollutants in fish. Comp. Biochem. Physiol. C. 81(2), 273-277.

Goksøyr, A., Förlin, L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquat. Toxicol. 22 (4), 287-311.

Görge, G., Nagel, R. 1990. Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Ecotox. Environ. Safe. 20 (3), 246-255.

Görge, G., Nagel, R. 1990. Kinetics and Metabolism of ¹⁴C-Lindane and ¹⁴C-Atrazine in Early Life Stages of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). Chemosphere 21(9), 1125-1137.

Gouy, V., Garon-Boucher, C., Ravanel, P., Tissut, M. 2001. Les produits phytosanitaires : de la parcelle au cours d'eau. Actes du colloque Lyon-Fleuves : Scientifiques et décideurs, agir ensemble pour une gestion durable des systèmes fluviaux, organisation Agence de l'Eau RMC. Lyon. 9 pages.

Grisolia, C.K., Ferrari, I. 1997. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate non-mutagenicity of the herbicide metolachlor. Braz. J. Genet. 20, 411-414.

Grisolia C.K., Cordeiro, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. Genet. Mol. Biol. 23, 235-239.

Grisolia C. K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutat. Res. 518, 145–150.

Guimont, S. 2005. Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy. 223 pages.

Gunkel, G., Streite, B. 1980. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, S-triazine) in a fresh water mollusc (*Ancylus fluviatilis* Müll.) and a fish (*Coregonus fera* Jurine). Water Res. 14, 1573–1584.

Gustavino, B., Scornajenghi, K.A., Minissi, S., Ciccotti, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. Mutat. Res. 494 (1-2), 151-159.

Guo, Q, Hu, C., Takeuchi, K. 2003. Integration of Modeling Runoff Generation and Sediment Transport in the Lower Yellow River. Proceedings of the 1st International Yellow river forum on river basin management, Vol III. 256-268.

Guttman, S.I. 1994. Population Genetic Structure and Ecotoxicology. Environ. Health Persp. 102 (12), 97-100.

Hall, L.W., Anderson, R.D., Kilian, J., Tierney, D.P. 1999. Concurrent exposure assessments of atrazine and metolachlor in the mainstem, major tributaries and small streams of the Chesapeake Bay watershed: Indicators of ecological risk. Environ. Monit. Assess. 59 (2), 155-190.

Hall, L.C., Rogers, J.M., Denison, M.S., Johnson, M.L. 2005. Identification of the herbicide Surflan and its active ingredient oryzalin, a dinitrosulfonamide, as xenoestrogens. Arch. Environ. Con. Tox. 48 (2), 201-208.

Hall, L.C., Okihiro, M., Johnson, M.L., The, S.J., 2007. Surflan™ and oryzalin impair reproduction in the teleost medaka (*Oryzias latipes*). Mar. Environ. Res. 63 (2), 115-131.

Halliwell, B., 1993. Oxidative DNA damage: meaning and measurement. In: Halliwell, B. and Aruoma, O.I., Editors, 1993. DNA and free radicals, Ellis Horwood, New York, pp. 67–79.

- Hamelink, J.L., P.F., Landrum, Bergman, H.L., Benson, W.H. 1994. Bioavailability: Physical, chemical, and biological interactions. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers.
- Hansch, C., D. Hoekman, A. Leo, L. Zhang, Li, P. 1995. The expanding role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in toxicology. *Toxicol. Lett.* 79, 45–53.
- Hartgers, E.M., Aalderink, G.H., Van den Brink, P.V., Gylstra, R., Wiegman, J.W.F. Brock, T.C.M. 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquat. Ecol.* 32, 135–152.
- Hassanein, H.M.A. 2002. Toxicological effects of the herbicide oxyfluorfen on acetylcholinesterase in two fish species: *Oreochromis niloticus* and *Gambusia affinis*. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 37(4), 521-527.
- Hassanein, .M., Banhawy, M.A., Soliman, F.M., Abdel-Rehim, S.A., Muller, W.E., Schroder, H.C. 1999. Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Con. Tox.* 37 (1), 78–84.
- Hauser, L., Heningway K.L., Wedderburn J., Lawrence A.J. 2003. Molecular/Cellular Processes and the Population Genetics of a Species, in A. J. Lawrence & K. L. Hemingway (Eds). *Effects of Pollution on Fish*. Blackwell Science Ltd.
- Hawkings, A.J.S., Bayne, B.L., Day, A.J., Rusin, J., Worrall, C.M. 1989. Genotype-dependent interrelation between energy metabolism, protein metabolism and fitness. In Ryland, J. S. and Tyler, P. A. (eds), *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms*. Olsen and Olsen, Fredensborg, pp. 283-292.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.* 399, 125–133.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(8), 5476–5480.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol.* 45, 51-88.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J.D., Vanparys, P., MacGregor, J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 277-291.
- Hong, J., Kim, H-Y., Kim, D.-G., Seo, J., Kim, K.-J. 2004. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1038, 27–35.
- Hose, J.E. 1994. Large-scale Genotoxicity Assessments in the Marine Environment *Environ. Health Persp.* 102 (S12), 29-32.

- Hoshina, M.M., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutat. Res.* 656, 44–48.
- Jacobs, M.N., Covaci, A., Schepens, P. 2002. Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environ. Sci. Technol.* 36 (13), 2797-2805.
- Jacomini, A.E., Bonato, P.S., Avelar, W.E.P. 2003. HPLC method for the analysis of atrazine in freshwater bivalves. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 26, 1885–1894.
- Jha, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 (3), 207-221
- Juhler, R.K. 1998. Supercritical fluid extraction of pesticides from meat: a systematic approach for optimisation. *Analyst.* 123, 1551-1556.
- Jurcikova, J., Mikula, P., Dobsikova, R., Nemethova, D., Svobodova, Z. 2007. Effects of metazachlor on vitellogenin induction in zebrafish (*Danio rerio*). *Acta Vet. Brno.* 76 (S8), S61-S66
- Jyothi, B., Narayan, G. 1999. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chem. Toxicol.* 37, 417-421.
- Kadenczki, L., Arpad, Z., Gardi, I., Ambrus, A., Gyorfi, L., Reese, G., Ebing, W., 1992. Column extraction of residues of several pesticides from fruits and vegetables: a simple multiresidue analysis method. *J. AOAC Int.* 75, 1–53.
- Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387 (3), 147-163.
- Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R. 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J. Appl. Ecol.* 47 (2), 498 -504.
- Kligerman, A.D., 1982. Fishes as a biological detector of the effects of genotoxic agents. In: Heddle, J.A. (Ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press, New York, pp. 435–453.
- Knezovich, J.P., Harrison, F.L., Wilhelm, R.G. 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water Air Soil Poll.* 32 (1-2), 233-245.
- Koehler A., Alpermann, T., Lauritzen, B., Van Noorden, C.J.F. 2004. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). *Acta Histochem.* 106 (2), 155-170.

- Konen, S., Cavas, T. 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 434-438.
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Avants, J.K., Fisk, A.T. 2006. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 80 (4), 372-381.
- Kotlik, P., Berrebi, P. 2001. Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.* 10, 2177-2185.
- Krause, R.T. 1985. Liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. I. Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, 726-733.
- Krein, A., Schorer, M. 2000. Road runoff pollution and its contribution to river sediments. *Wat. Res.* 34 (16), 4110-4115.
- Kross, B.C., Vergara, A., Raue, L.E. 1992. Toxicity assessment of atrazine, alachlor, and carbofuran and their respective environmental metabolites using Microtox. *J. Toxicol. Environ. Health.* 37 (1), 149-59.
- Krynitsky, A.J., Stafford, C.J., Wiemeyer, S.N. 1988. Combined extraction-cleanup column chromatographic procedure for determination of dicofol in avian eggs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 539-542.
- Kumar, R., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Lakra, W.S. 2010. Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Arch. Environ. Con. Tox.* 58 (1), 123-130.
- Kumaravel, T.S., Bristow, R.G. 2005. Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells sing Comet-FISH. *Breast Cancer Res. Tr.* 91 (1), 89-94.
- Kurelec, B. 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35, 341-348.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F. eds. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N.L. 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered pacific salmon. *Environ. Health Persp.* 117 (3), 348-353.
- Landolt, M.L., Kocan, R.M. 1983. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. *Advances in environmental science and technology.* 13, 335-353.

- Lányi, K., Dinya, Z. 2005. Photodegradation Study for Assessing the Environmental Fate of Some Triazine-, Urea- and Thiolcarbamate-type Herbicides. *Microchem. J.* 80, 79-87.
- Larno, V., Laroche, J., Launey, S., Flammarion, P., Devaux, A. 2001. Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P450 1A induction. *Ecotoxicology* 10, 145–158.
- Lee, R., Kim, G.B., Maruya, K.A., Steinert, S.A., Oshima, Y. 2000. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants, *Mar. Environ. Res.* 50, 553–557.
- Lee, R.F., Steinert, F. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43-64.
- Lemos, C.T, Milan Rodol, P., Terra, N.R., D'Avila de Oliveira, N.C., Erdtmann, B. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391-401.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C. 2001. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167, 3-23.
- Lewis, C., Galloway, T. 2009. Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 43 (3), 928-933.
- Liu, X.M., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Chen, X-Y. 2006. Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Environ. Toxicol.* 21(1), 80-89.
- Llorente, M.T., Martos, A., Castaño, A. 2001. Detection of Cytogenetic Alterations and Blood Cell Changes in Natural Populations of Carp. *Ecotoxicology* 11 (1), 27-34.
- Léonard, R.A. 1990. Movement of pesticides into surface waters. Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modelling. Soil Science society of America Book Series, 2, Cheng HH, Denver, 303-349.
- Lydy, M.J., Linck, S.L. 2003. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Arch. Environ. Con. Tox.* 45 (3), 343-349.
- Lydy, M., Belden, J., Wheelock, C., Hammock, B., Denton, D. 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol. Soc.* 9 (6) 1.
- Macary, F., Lavie, E., Lucas, G., Riglos, O. 2006. Méthode de changement d'échelle pour l'estimation du potentiel de contamination des eaux de surface par l'azote. *Ingénieries - E A T* 46, 35-49.

- MacGregor, J.T. 1991. Micronucleus assay protocols. *Mutat. Res.* 259 (1), 123-125.
- MacCarthy, I.D., Fuiman, L.A. 2008. Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion. *Aquat. Toxicol.* 88 (4), 220-229.
- Mackay, D., Fraser, A. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ. Pollut.* 110 (3), 375-391.
- Mackay, D. 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 16 (5), 274-278.
- McKenna, D.J., Rajab, N.F., McKeown, S.R., McKerr, G., McKelvey-Martin, V.J. 2003. Use of the Comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines. *Radiat. Res.* 159, 49-56.
- Maceina, M.J., Marshall, M.D., Sammons, S.M. 2008. Impacts of endothall applications on largemouth bass spawning behavior and reproductive success. *N. Am. J. Fish Manage.* 28 (6) 1812-1817.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. 2001. Comparative study on total lipid Determination using soxhlet, roese-gottlieb, bligh & dyer, and modified bligh & dyer extraction methods. *J. Food Compos. Anal.* 14, 93-100.
- Mann, R.H.K. 1996. Environmental requirements of European non-salmonid fish in rivers. *Hydrobiologia.* 323 (3), 223-235.
- Manna, G.K., Sadhukhan, A. 1986. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Curr. Sci. India.* 55 (10), 498-501.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M-T., Laroche, J. 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70 (4), 327-343.
- Menone, M.L., Aizpun de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Lanfranchi, A.L., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D. 2000. PCBs and organochlorines in tissues of Silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a Coastal Lagoon in Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 202-208.
- Merk, O., Reiser, K., Speit, G. 2000. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutat. Res.* 471 (1-2), 71-80.
- Migliore, L., Cocchi, L., Scarpato, R. 1996. Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis.* 11(3), 285-90.
- Mikula, P., Modra, H., Nemethova, D., Groch, L., Svobodova, Z. 2008. Effects of subchronic exposure to LASSO MTX (Alachlor 42% W/V) on hematological indices

and histology of the common carp, *Cyprinus carpio*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81:475–479.

Miller, M.A., Madenjian, C.P., Masnado, R.G. 1992. Patterns of organochlorine contamination in lake trout from Wisconsin water of the Great-lakes. J. Great Lake Res. 18 (4), 742-754.

Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. Mutat. Res. 367, 245-251.

Miron, D.S., Crestani, M., Shettinger, M.S., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, MA., Moraes G., Vieira, V.L.P. 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). Ecotox. Environ. Safe. 61 (3), 398-403.

Miron, D.S., Pretto, A., Crestani, M., Glusczak, L., Schetinger, M.S., Loro V.L., Morsch V.M. 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*) Chemosphere. 74 (1), 1-5.

Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat. Res. 399 (2), 135-147.

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010. Roundup (R) causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. 78 (3), 294-299.

Moore, A., Waring, C.P. 1998. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Pestic. Biochem. Phys. 62 (1), 41-50.

Moraes, B.S., Loro, V.L., Glusczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., de Oliveira Machado, S. 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 68 (8), 1597-1601.

Moraes B.S., Loro, V.L., Pretto, A., da Fonseca, M.B., Menezes, C., Marchesan, E., Reimche, G.B., de Avila, L.A. 2009. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. Pestic. Biochem. Phys. 95 (2), 57-62.

Myers, M.S., French, B.L., Reichert, W.L., Willis, M.L., Anulacion, B.F., Collier, T.K., Stein, J.E. 1998. Pollutant Responses in Marine Organisms Reductions in CYP1A expression and hydrophobic DNA adducts in liver neoplasms of English sole (*Pleuronectes vetulus*): Further support for the 'resistant hepatocyte' model of hepatocarcinogenesis. Mari. Environ. Res. 46 (1-5), 197-202.

- Nacci, D.E., Cayula, S., Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35 (3-4), 197-210.
- Nadzialek, S., Spanò, L., Mandiki, S.N., Kestemont, P. 2008. High doses of atrazine do not disrupt activity and expression of aromatase in female gonads of juvenile goldfish (*Carassius auratus* L.). *Ecotoxicology* 17(6), 464-70.
- Nebeker, A.V., Schuytema, G.S., 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Arch. Environ. Con. Tox.* 35 (3), 441-446.
- Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Spano, M.A., Centeno, A.J. 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (3), 293-297.
- Norman, K.N.T., Panton, S.H.W. 2001. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 907 (1-2), 247-255.
- Muñoz, I., Rosés, N. 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). *Water Res.* 34 (10), 2846-2848.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K. 2010. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 48 (1), 202-208.
- O.E.C.D. 1997. Guidelines for testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline. 474.
- Oikari, A. 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquat. Toxicol.* 78, 370-381.
- Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banáth, J.P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 198 (2), 259-267.
- Östling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- Oppenhulzen, A., Vandervelde, E.W., Gobas, F.A.P.C., Liem, D.A.K, Vandersteen, J.M.D., Hutzinger, O. 1985. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere.* 14 (11-12), 1871-1896.

- Oruc, E..O, Uner, N. 1999. Effects of 2,4-diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. Environ. Pollut. 105 (2), 267-272.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., Bleeker, E.A.J. 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. Environ. Pollut. 119, 195–202.
- Ovidio, M., Parkinson, D., Philippart, J.-C., Baras, E. 2007. Multiyear homing and fidelity to residence areas by individual barbel (*Barbus barbus*). Belg. J. Zool., 137 (2), 183-190.
- Oztetik, E. 2008. A tale of plant Glutathione S-transferases: Since 1970. Bot. Rev. 74 (3), 419-437.
- Padula, D.J., Daughtry, B.J., Nowak, B.F. 2008. Dioxins, PCBs, metals, metalloids, pesticides and antimicrobial residues in wild and farmed Australian southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). Chemosphere. 72 (1), 34-44.
- Pena-Llopis, S., Pena, J.B., Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D. 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. Chemosphere. 45 (4-5), 671-681.
- Perry, D. M., Wels, J. S., Wels, P. 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17, 569–574.
- Pfuhler, S., Wolf, H.U. 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. Environ. Mol. Mutagen. 27 (3), 196-201.
- Phyu, Y.L., Warne, M.St.J., Lim, R.P. 2006. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. Sci. Total Environ. 356 (1-3), 86-99.
- Pietrapiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C., Vacchi, M. 2002. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). Mar. Pollut. Bull. 44 (3), 238-243.
- Plhalova, L., Macova, S., Haluzova, I., Slaninova, A., Dolezelova, P., Marsalek, P., Pistekova, V., Bedanova, I., Voslarova, E., Svobodova, Z. 2009. Terbutryn toxicity to Danio rerio: effects of subchronic exposure on fish growth. Neuro. Endocrinol. Lett. 30 (Suppl 1), 242-247.
- Poleksic, V., Karan, V. 1999. Effects of trifluralin on carp: Biochemical and histological evaluation. Ecotox. Environ. Saf. 43 (2), 213-221.
- Prieto, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M. 2008. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). Environ. Toxicol. Chem. 27(5), 1152-11599.

Ramirez-Duarte, W.F., Rondon-Barragan, I.S., Eslava-Mocha, P.R. 2008. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup ® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). *Pesquisa Vet. Brasil.* 28 (11), 547-554.

Ramirez, W., Rondon, I., Vidal H., Eslava P. 2009. Acute toxicity and histopathological lesions in silver Pacu (*Piaractus brachypomus*) exposed to a mixture of the herbicides Roundup and the surfactant Cosmoflux 411F. *Rev. Mvz Cordoba* 14 (1), 1563-1575.

Richards, R.P., Baker, D.B. 1993. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie Basin. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 13-26.

Rodriguez-Ariza, A., Alhama, J., Diaz-Mendez, F.M., Lopez-Barea, J. 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438 (2), 97-107.

Rohr, J.R., McCoy, K.A. 2010. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. *Environ. Health Persp.* 118 (1), 20-32.

Roth, C.H., Helming, K. 1992. Surface seal properties, runoff formation and sediment concentration as related to rainfall characteristics and the presence of already formed crusts. *Soil Technol.* 5 (4), 359-368.

Saglio, P., Trijasse, S. 1998. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish Arch. *Environ. Con. Tox.* 35 5 (3), 484-491.

Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto B., Loro, V.L. 2010. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Con. Tox.* 58 (3), 740-745.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M. D., Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotox. Environ. Safe.* 46 (1), 57-63.

Scholz, S., Mayer, I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293 (1-2), 57-70.

Schultz, N., Norrgren, L., Gawe, J., Johannisson, A., Medhage, O. 1993. Micronucleus frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subject to radiation, an image analysis and flow cytometric study. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 207-211.

Seelbach, A., Fissler, B., Strohmbschi, A., Madle, S. 1993. Development of a modified micronucleus assay in vitro for detection of aneugenic effects. *Toxicol. in vitro.* 7 (2), 185-193.

- Sethajintanin, D., Johnson, E.R., Loper, BR, Anderson, K.A. 2004. Bioaccumulation profiles of chemical contaminants in fish from the lower Willamette River, Portland Harbor, Oregon. *Arch. Environ. Con. Tox.* 46 (1), 114-123.
- Shinn, 2010. Impact of toxicants on stream fish biological traits Thèse de l'Université de Paul Sabatier, Toulouse, 126 p.
- Shugart, L.R. 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: *Biomarkers of environmental contamination* (eds. McCarthy J. F., Shugart L. R.), pp. 205-216. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton.
- Shugart, L.R., Theodorakis, C. 1998. New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy* 11, 119–127.
- Shugart, L.R. 2000. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. *Ecotoxicology*. 9 (5), 329-340.
- Shukla, D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Singh, P. 2010. Assesement of genotoxicity of Dichlorvos to *Mystus vittatus* (Bloch) by comet assay. *Indian J. Fish.* 57 (2), 39-44.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1), 184-191.
- Singh, S.B., Foster, G.D., Khan, S.U. 2004. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of Thiamethoxam, Imidacloprid, and Carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. *J. Agric. Food Chem.* 52 (1), 105-109.
- Smital, T., Sauerborn, R. 2002. Measurement of the activity of multixenobiotic resistance mechanism in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mar. Environ. Res.* 54 (3-5), 449-453.
- Snyder, J.M., King, J.W. 1993. Supercritical fluid extraction of poultry tissues containing incurred pesticide residues. *J. AOAC Int.* 76 (4), 888-892.
- Soldatov, A.A. 1995. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41, 272-281.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J. 2008. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crc Cr. Rev. Toxicol.* 38 (9), 721-772.
- Sondhia, S. 2008. Evaluation of potential risk of herbicides bioaccumulation in fishes. *Proceedings of Taal 2007: The 12th World Lake Conference*. Sengupta, M., Dalwani, R. (Eds), pp 149-151.
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E., Wagner, E.D., Plewa, M.J., 2005. Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environ. Mol. Mutagen.* 46,174-181.

- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., da Silva L.B., Ritter, F., Calliari Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Phar.* 23 (3), 308-313.
- Sousa, R., Nogueira, A. J. A., Gaspar, M. B., Antunes, C., Guilhermino, L. 2008. Growth and extremely high production of the non-indigenous invasive species *Corbicula fluminea* (Muller, 1774): Possible implications of ecosystem functioning. *Estuar. Coast Shelf S.* 80, 289-295.
- Spanò, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thoméc, J-P, Kestemont, P. 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 66, 369-379.
- Speit, G., Hartmann, A. 1995. The contribution of excision-repair to the DNA effects seen in the alkaline single-cell gel test (comet assay). *Mutagenesis.* 10 (6), 555-559.
- Srut, M., Stambuk, A., Pavlica, M., Klobucar, G.I.V. 2010. Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity. *Arh. Hig. Rada Toksiko.* 61 (1), 29-36.
- Stein, J.E., Reichert, W.L., Nishimoto, N., Varanasi, U. 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical ethiology: II. Biochemical Studies. *Sci. Total Environ.* 94, 51-69.
- Steinert, S.A., Streib Montee R., Leather, J.M., Chadwick, D.B. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.* 399, 65-85.
- Strandberg, B., Bergqvist, P.-A., Rappe, C. 1998. Dialysis with semipermeable membranes as an efficient lipid removal method in the analysis of bioaccumulative chemicals *Anal. Chem.* 70, 526-533.
- Sun, F., Wong, S.S., Li, G.C., Chen, S.N. 2005. Multiresidue determination of pesticide in fishery products by a tandem solid-phase extraction technique, *J. Food Drug Anal.* 13, 151-158.
- Suzawa, M., Ingraham, H.A. 2008. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal nr5a nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS One* :doi:10.1371
- Swackhamer, D.L., Skolund, D.S. 1994. Kinetic-model for organic contaminant bioaccumulation in phytoplankton. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 207 (1), 136.
- Tagaki, T. 2010. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 204, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Whitacre D.M. (ed.)

Taghavi, L., Probst, J-L., Merlina, G., Marchand, A-L., Durbe, G., Probst, A. 2010. Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montousse at Aurade, south west France). *Int. J. Environ. An. Ch.* 90, 390-405.

Talapatra, S.N., Banerjee, S.K. 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food Chem. Toxicol.* 45, 210–215.

Tarja, N., Kirsti, E., Marja, L., Kari, E. 2003. Thermal and metabolic factors affecting bioaccumulation of triazine herbicides by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol.* 18 (4), 219-226.

Theodorakis, C.W., Dsurney, S.J., Shugart, L.R. 1994. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood-cells by agarose-gel electrophoresis. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 (7), 1023-1031.

Theodorakis, C.W., Blaylock, B.G., Shugart, L.R. 1997. Genetic ecotoxicology .1. DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology* 6 (4), 205-218.

Theodorakis, C.W., Shugart, L.R. 1998. Natural selection in contaminated habitats: A case study using RAPD genotypes. In V.E. Forbes (ed.). *Genetics and Ecotoxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis. pp. 123-150.

Theodorakis, C.W., Swartz, C.D., Rogers, W.J., Bickham, J.W., Donnelly, K.C., Adams, S.M. 2000. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 7 (2), 131-143.

Thomas, P., Wofford, W., 1993. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquat. Toxicol.* 27 (1-2), 159-177.

Thurman, E.M., Goolsby, D.A. , Meyer, M.T., Kolpin, D.W. 1991. Herbicides in surface waters of the midwestern United States: the effect of spring flush. *Environ. Sci. Tech.* 1704-1796.

Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Meyer, M.T., Mills, M.S., Pomes, M.S., Kolpin, M.L. 1992. A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of the midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2440-2447.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Tilghman, A., Garric, J., Coquery, M. 2009. La mesure des contaminants dans le biote : avantages et inconvenients pour la surveillance chimique du milieu continental. Cemagref, 49 p.

- Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J.J., Richter, C.A. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 99 (2), 149-159.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R. 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 280 (4), 291-5.
- Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A., Aoki, S. 1997. Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorous insecticides and their oxidation products in Killifish. *Chemosphere.* 35 (5), 939-949.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere.* 52 (7), 1189-1197.
- Tutundjian, R., Cachot, J., Leboulenger, F., Minier, C. 2002. Genetic and immunological characterisation of a multixenobiotic resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Phys. B.* 132 (2), 463-471.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204.
- U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Bethesda, MD, 1995.9-9
- Uyanikgil, Y., Yalcinkaya, M., Ates, U., Baka, M., Karakisi, H. 2009. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid formulation on medulla spinalis of *Poecilia reticulata*: A histopathological study. *Chemosphere* 76 (10), 1386-1391.
- Van Beneden, R.J. 1994. Molecular analysis of bivalve tumors: models for environmental/genetic interactions. *Environ Health Persp.* 102 (S12), 81–83
- van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) .1.Bioaccumulation: Biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol.* 35 (1), 21-46.
- van der Oost, R., Lopes, S.C.C., Komenc, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): Use of a bioactivation : detoxication ratio as a Biotransformation Index (BTI). *Mar. Environ. Res.* 46 (1-5), 315-319.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13, 57-149.

- Vanzella, T.P., Martinez, C.B., Cólus, I.M. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631(1), 36-43.
- Veith, G.D., Defoe, D.L., Bergstedt, B.V. 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *J. Fish Res. Board Can.* 36 (9), 1040-1048.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V. 2008. Effect of metribuzin on some biochemical, haematological and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Lett.* 180 (S1), S176-S176.
- Verma, S.R., Rani, S., Tonk, P.I., Dalela, R.C., 1983. Pesticide induced dysfunction in carbohydrate metabolism in three freshwater fishes. *Environ. Res.* 32, 127–133.
- Vigano, L., Arillo, A., Falugi, C., Melodia, F., Polesello, S. 2001. Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (10) 887-894.
- Vigreux, C., Poul, J. M., Deslandes, E., Lebailly, P., Godard, T., Sichel, F., Henry-Amar, M., Gauduchon, P. 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutat. Res.* 419, 79-90.
- Villalobos, S.A., Hamm, J.T., Teh, S.J., Hinton, D.E. 2000. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. *Aquat. Toxicol.* 48 (2-3), 309-326.
- Vioque-Fernandez, A., de Almeida, E.A., Lopez-Barea, J. 2009. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers.* 14 (5), 299-310.
- Volta, P., Tremolada, P., Neri, M.C., Giussani, G., Galassi, S. 2009. Age-dependent bioaccumulation of organochlorine compounds in fish and their selective biotransformation products in top predators from Lake Maggiore (Italy). *Water Air Soil Pollut.* 197, 193–209.
- Wacksman, M.N., Maul, J.D., Lydy, M.J. 2006. Impact of atrazine on chlorpyrifos toxicity to four aquatic vertebrates. *Arch. Environ. Con. Tox.* 51, 681–689.
- Wagner, G., Bertel, A., Klein, R., Neitzke, M., Nentwich, K., Paulus, M., Quack, M. 2003. Guideline for sampling and sample treatment for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Federal Environment Agency. Environmental Species Banking des Bundes. Guidelines for Sampling, Transport, Storage, and Chemical Characterisation of Environmental and Human Organ Samples.
- Walsh, A.H., Ribelin, W.E. 1975. The pathology of pesticide poisoning. *In*: W. E. Ribel & E. Migahi (eds), *The pathology of fish*. University of Wisconsin Press, pp. 1-22.

- Waring, C.P., Moore, A. 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquat. Toxicol.* 66 (1), 93-104.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Beckers, P.W.M.A., Burt, J.P. 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Contam. T.* 123, 1-164.
- Weed Science Society of America. Herbicide Handbook, Seventh Edition. Champaign, IL, 1994. 9-5.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S., Anderson, S.L. 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 2868-2877.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C. 2000. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 45 (2), 122-131.
- Williams, R.C., Metcalfe, C.D. 1992. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 23, 193-202.
- Wirgin, I., Waldman, J.R. 1998. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutat Res.* 399 (2), 193-219.
- Wolf, M.C., Moore, P.A. 2002. The effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *J. North Am. Benthol. Soc.* 21, 457–467.
- Wurgler, F.E., Krammers, P.G.N. 1992. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*, 7, 321-327.
- Xie, L., Klerks, P.L. 2004. Fitness costs of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (6), 1499–1503.
- Yadav K.K., Trivedi, S.P. 2009. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere.* 77 (11), 1495-1500.
- Yadav, A.S., Bhatnagar, A., Kaur, M. 2010. Assessment of Genotoxic Effects of Butachlor in Fresh Water Fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Res. J. Environ. Toxicol.* 4 (4), 223-230.
- Yang, W., Gan, J., Hunter, W., Spurlock, F. 2006. Effect of suspended solids on bioavailability of pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (6), 1585–1591.
- Yi, W., Ding, H., Lu, Y., Liu, H., Zhang, M., Jiang, W. 2007. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere.* 68, 1576-1581.

Yim, U.H., Hong, S.H., Shim, W.J., Oh, J.R. 2005. Levels of persistent organochlorine contaminants in fish from Korea and their potential health risk. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48, 358–366.

Young, I.S., McEneny, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 29. 358–62.

Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, J., Wang, J., Su, J., Yu, C. 2010. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. n/a. doi:10.1002/tox.20575

Zoll-Moreux, C., Ferrier, V. 1999. The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: Two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Res. 33 (10), 1-2314.